

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR L'ACTION COMBINÉE DU ZINC ET DES VITAMINES DANS L'ALIMENTATION DES ANIMAUX (1)

par GABRIEL BERTRAND et R. C. BHATTACHERJEE.

L'un de nous a fait connaître, en 1922, les recherches qu'il avait entreprises avec B. Benzon (2) dans le but de savoir si d'aussi petites proportions de zinc que celles rencontrées dans l'organisme des animaux jouent un rôle quelconque dans les échanges nutritifs et le développement général de l'individu.

Des souris provenant d'une même portée avaient été partagées en deux lots et nourries, les unes avec des aliments minutieusement débarrassés du zinc qu'ils renferment toujours à l'état naturel, les autres avec les mêmes aliments additionnés d'une portion de zinc égale à celle qui avait été soustraite (1/50.000^e, soit 0 gr. 002 pour 100 grammes d'aliments).

Le haut degré de purification des substances nutritives qu'il avait été nécessaire d'atteindre avait entraîné la disparition complète des facteurs oligosynergiques de croissance et de santé que l'on désigne communément, depuis C. Funck, sous

(1) Un extrait de ce mémoire a été publié dans les *C. R. Ac. Sc.*, 193, 1934, p. 1823.

(2) Gab. BERTRAND et B. BENZON. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 6, 1924, p. 205 et *Ces Annales*, 38, 1924, p. 405. Voir aussi Gab. BERTRAND et H. NAKAMURA. *Ces Annales*, 39, 1925, p. 328.

le nom de *vitamines*. Et, comme à cette époque, on ne connaissait pas de vitamines pures, mais seulement des préparations vitaminées renfermant trop de zinc pour être mises à profit sans enlever aux résultats toute leur rigueur, il avait fallu s'en passer. Dans ces conditions, les animaux étaient condamnés à mourir dans un délai assez court. Il a été reconnu, néanmoins, autant de fois que l'expérience a été reproduite, que les souris soumises au régime additionné de zinc survivaient un peu plus longtemps que les souris alimentées sans zinc.

On pouvait espérer, ainsi que cela a été exprimé en publiant ce résultat, que le jour où l'on parviendrait à isoler les vitamines à l'état pur, il serait possible d'obtenir, par leur adjonction au régime synthétique, des différences de survies plus importantes entre les deux lots de souris et, par suite, une démonstration plus frappante de l'importance du zinc dans le phénomène global de la nutrition.

Or, des progrès remarquables ont été accomplis, au cours de ces dernières années, dans le domaine des vitamines : grâce à de nombreuses recherches, notamment de Willstätter, Drummond, von Euler, Karrer, Steenbock, Rosenheim, Hess, Windaus, Funck, Seidell, Smith, Ohdake, Szent-Györgyi, les plus importantes de ces substances ont été obtenues à l'état défini ou, tout au moins, sous une forme très concentrée, de haute activité physiologique. On ne risque plus alors d'introduire de zinc avec elles dans les régimes synthétiques.

En outre, il a été découvert que le nickel et le cobalt comptent parmi les éléments de la matière vivante, végétale (1) et animale (2), et qu'ils interviennent comme le zinc, le fer et le manganèse dans l'alimentation (3).

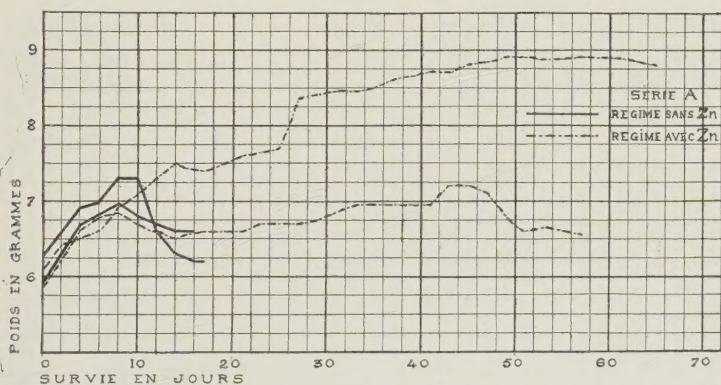
Tenant compte de ces progrès, nous avons repris les expériences de 1922 avec l'espoir d'arriver, si possible, à des preuves incontestables de l'importance du zinc dans la nutrition des animaux.

(1) Gab. BERTRAND et M. MOKRAGNATZ. *Bull. Soc. chim.*, **37**, 1925, p. 326, et **47**, 1930, p. 326; Ces *Annales*, **44**, 1930, p. 543; N. G. VERNADSKY. *C. R.*, **175**, 1922, p. 382.

(2) Gab. BERTRAND et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. chim.*, **37**, 1925, p. 934 et **39**, 1926, p. 942; *Ibid.*, **42**, 1927, p. 1213; *C. R. Ac. Sc.*, **182**, 1926, p. 1504 et **183**, 1926, pp. 5 et 257.

(3) Gab. BERTRAND et H. NAKAMURA. *Bull. Soc. chim.* (4), **42**, 1927, p. 321.

A part les modifications de régime que nous décrirons plus loin, nous avons suivi dans les nouvelles recherches la même technique expérimentale que dans les précédentes. C'est ainsi que les jeunes souris ont été séparées de leur mère le vingt et unième jour après la naissance, au moment où leur teneur en zinc est réduite au minimum; que ces souris ont été élevées isolément dans des conserves en verre, de façon à éviter toute contamination métallique; que les lots ont toujours été constitués à partir d'animaux de la même portée pour qu'ils soient aussi comparables que possible au point de vue physiologique, etc.



GRAPHIQUE A.

Les substances alimentaires, organiques et minérales, ont été purifiées par les mêmes procédés et avec les mêmes soins, à cela près que les traitements de la fécule, de la caséine, de la cellulose, du sucre de lait et du lactate de calcium ont été poussés plus loin encore, comme dans les recherches sur l'importance physiologique du nickel et du cobalt (1), de façon à obtenir la plus grande garantie possible quant à l'élimination du zinc. Nous rappelons que, lors des expériences de 1922, 100 grammes de ces substances purifiées renfermaient déjà moins de 0 gr. 00005 de zinc, quantité correspondant à la limite de sensibilité de la méthode d'analyse utilisée (2).

Après leur purification, les substances alimentaires ont été

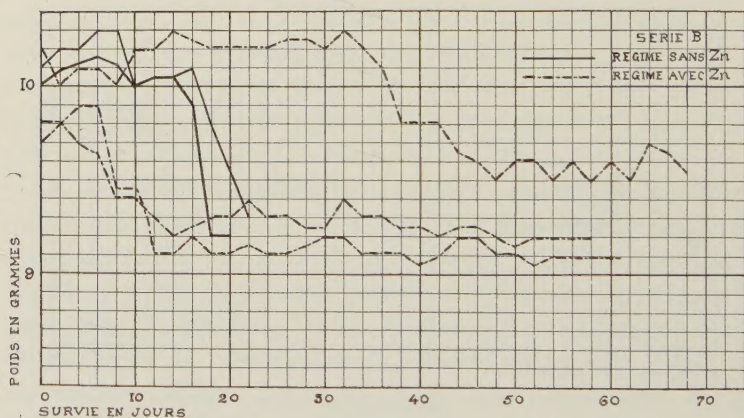
(1) *Loc. cit.*

(2) Gab. BERTRAND et M. JAVILLIER. *Bull. Soc. chim.* (4), 3, 1907, p. 114.

mélangées et transformées en pâte, à l'aide d'un peu d'eau, sans rien changer, ni dans les proportions, ni dans le mode opératoire, sauf l'adjonction d'une petite quantité de nickel et de cobalt : 0 gr. 00025 de chlorure de nickel et 0 gr. 0001 de sulfate de cobalt pour 100 grammes (1).

Bien entendu, il a été préparé séparément un mélange alimentaire sans zinc pour les souris témoins et un mélange alimentaire additionné de zinc (0 gr. 010 de sulfate cristallisé équivalant à 0 gr. 002 de métal pour 100 grammes) pour les autres souris.

Finalement, les mélanges, de consistance pâteuse épaisse,



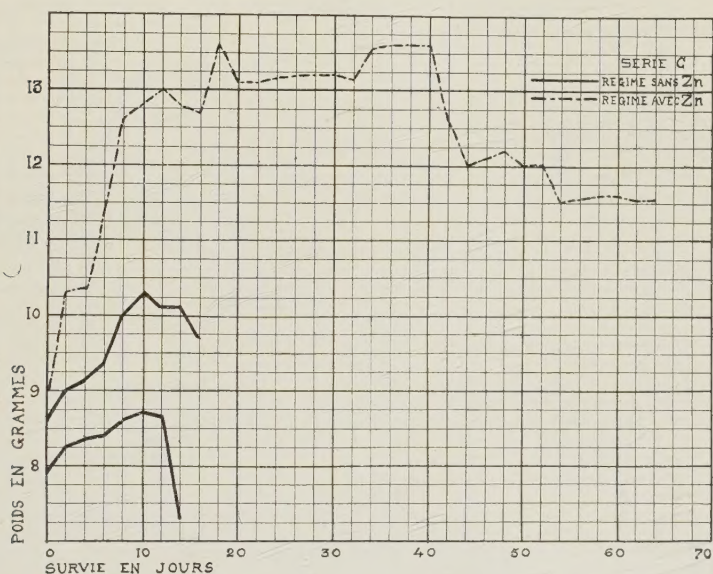
GRAPHIQUE B.

ont été façonnés en petits pains que l'on a cuits au four électrique. On conservait ces petits pains, préparés par portions d'à peu près 125 grammes, dans des flacons bouchés à l'émeri et mis à la glacière. Au moment de l'emploi, on les brisait en petits fragments que l'on distribuait chaque matin, en quantité suffisante, pour que les animaux en aient à discrétion.

On a procédé autrement pour les vitamines. Celles-ci ont été administrées aux souris sous forme de solutions titrées, versées par microgouttes sur un petit fragment de pain synthétique. Le fragment imprégné de vitamines a été donné avant le renouvellement de la ration journalière; les animaux l'ont mangé presque toujours avec avidité.

(1) Gab. BERTRAND et H. NAKAMURA. *Bull. Soc. chim.* (4), 42, 1927, p. 321.

Nous avons pris : 1° comme vitamine A, ou plutôt comme source de vitamine A, du carotène cristallisé, obtenu par nous à partir de la racine de carotte; ce carotène était dissous dans l'huile d'olive et donné chaque jour à la dose de 0 gr. 00001; 2° comme vitamine D, de l'ergostérol irradié, obligeamment préparé et titré par O. Bailly, aussi en solution dans l'huile d'olive; une microgoutte de cette solution correspondait à la dose journalière de 0 gr. 000001 de substance active; 3° enfin,



GRAPHIQUE C.

comme vitamines B¹ et B², un extrait de levure de bière n° 34 H, préparé par A. Seidell (1) et que nous avons enrichi d'après le procédé de M. I. Smith (2). L'activité de l'extrait était environ cent fois plus grande en vitamine B¹ et de soixante à soixante-

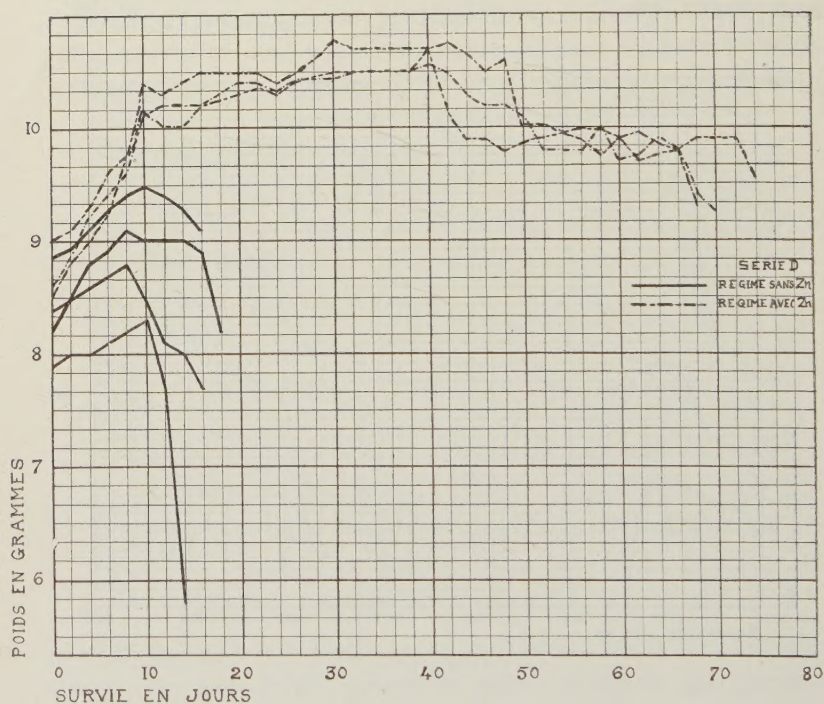
(1) ATHERTON SEIDELL et VICTOR BIRCKER. *Journ. of Amer. chem. Soc.*, **53**, 1931, p. 2288.

(2) Dans ce procédé, décrit dans une communication privée de l'auteur, un échantillon de 20 grammes d'extrait de levure n° 34 H, qui, au point de vue de la vitamine B², est environ huit fois et demie plus actif que la levure sèche de brasserie avec laquelle il a été préparé, est mis à bouillir doucement au réfrigérant ascendant avec 100 cent. cubes d'alcool méthylique contenant 5 p. 100 d'acide chlorhydrique. La solution est concentrée à moitié, neutralisée partiellement avec du bicarbonate de sodium, et versée dans dix

dix fois plus grande en vitamine B^a que la levure sèche. Il a été distribué, dissous dans l'eau, à la dose de 0 gr. 001 par jour.

Nous n'avons pas ajouté de vitamine antiscorbutique, la souris passant, avec le rat et le pigeon, pour ne pas avoir besoin de cette substance.

Nous avons expérimenté de deux manières l'action des vita-

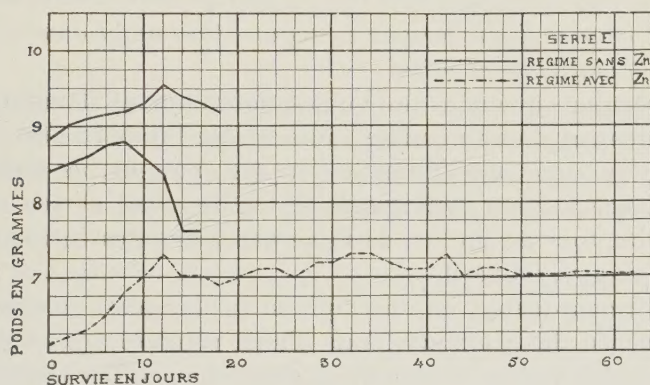


GRAPHIQUE D.

mines. Lorsque les souris sont séparées de leur mère, à l'âge de vingt et un jours, elles renferment dans leurs organes une petite provision de vitamines capable d'assurer leur accroissement à l'aide du pain synthétique pendant une dizaine de jours. Utilisant cette observation et pour rendre plus apparente l'action des vitamines expérimentées, nous n'avons administré

fois son volume d'acétone. Un précipité finement granuleux est obtenu qui, après lavage et dessiccation, pèse 2 gr. 3. C'est l'extrait enrichi dont nous nous sommes servis.

ces dernières substances aux deux lots de souris, dans certaines de nos séries d'expériences, qu'à partir du dixième jour. A ce moment, le poids des animaux cessait d'augmenter ou même commençait à diminuer. Malgré la présence des vitamines, les souris appartenant aux lots sans zinc ont continué à maigrir, leur pelage s'est hérissé, puis elles sont mortes en quelques jours avec des troubles manifestes de l'équilibre, accompagnés de paralysie du train postérieur. Au contraire, les souris appartenant aux lots avec zinc, après avoir présenté parfois mais passagèrement des symptômes de même nature, ont maintenu ou même augmenté leur poids et ce n'est que beaucoup



GRAPHIQUE E.

plus tard qu'elles ont, peu à peu, succombé. C'est ce que l'on voit très bien sur les graphiques des séries A, B, C, D et E.

Nous avons aussi administré les vitamines aux animaux dès le premier jour de l'alimentation artificielle. L'allure des résultats n'a pas été modifiée ainsi que le montre le graphique de la série D.

Au total, nos expériences ont été effectuées sur 22 animaux provenant de cinq portées. Douze de ces animaux ont été soumis au régime alimentaire sans zinc et 10 au régime alimentaire contenant du zinc.

Les 12 souris sans zinc ont vécu de quatorze à vingt-trois jours, soit en moyenne seize jours neuf dixièmes, et les 10 souris avec zinc de cinquante-sept à soixante-quatorze jours, soit en moyenne soixante-quatre jours quatre dixièmes.

Nous avons dosé le zinc contenu dans les cadavres des animaux morts, après avoir vidé aussi bien que possible le tube digestif. Les 12 souris du lot alimenté sans zinc renfermaient en moyenne 0 milligr. 227 de métal et les 10 souris du lot ayant reçu du zinc 0 milligr. 434. Ainsi, sur 1 milligramme au plus de métal présent dans le pain qu'elle avait consommé, chacune des souris du dernier lot en avait fixé dans ses tissus 0 milligr. 207, en moyenne.

Il a donc suffi que les animaux assimilent environ 2/10 de milligramme du zinc contenu dans les aliments pour que leur survie expérimentale passe de deux à trois semaines, quand ils étaient soumis au régime sans zinc, à près de deux mois et même de deux mois et demi, lorsque ce régime était additionné d'une minime quantité de ce métal.

Les résultats que nous publions aujourd'hui ne démontrent pas seulement d'une manière indiscutable l'importance individuelle du zinc dans l'alimentation des animaux, ils mettent en évidence l'action synergique du même métal et des vitamines, ou, tout au moins, de l'une des vitamines introduites dans le régime artificiel.

Il est remarquable, en effet, que si le zinc n'est intervenu, en l'absence de vitamines, que d'une manière très limitée dans les phénomènes de nutrition des animaux, les vitamines n'ont manifesté aucune action lorsqu'elles ont été administrées à l'exclusion de toute trace de zinc. Il y a là un fait nouveau et d'un intérêt d'autant plus grand au point de vue biologique qu'il ne doit pas être exceptionnel; à la lumière d'autres observations, il apparaît plutôt comme un exemple particulièrement démonstratif de la synergie qui doit exister entre les nombreux facteurs dont dépendent les processus chimiques de la vie (1).

(1) Voir à ce sujet : Gab. BERTRAND : « Sur le bleuissement de certains champignons du genre « Boletus ». *Bull. Soc. chim.* (3), 27, 1902, p. 453 ; Ces *Annales*, 16, 1902, p. 179 ; également : « Ueber die physiologische Bedeutung des Mangans und anderen Elemente die sich in den Organismen spurenweise vorfinden » (*Zeits. f. angew. Chem.*, 44, 1931, p. 917).

**MISE EN ÉVIDENCE
DU VIRUS TUBERCULEUX DANS LE SANG
PAR LA MÉTHODE
DES INJECTIONS D'EXTRAIT ACÉTONIQUE
DE BACILLES DE KOCH. CARACTÈRES DES SOUCHES
DE BACILLES TUBERCULEUX AINSI ISOLÉS**

par L. NÈGRE et J. BRETEY.

Il ressort, de tous les travaux des auteurs qui ont étudié la bacillémie tuberculeuse chez l'homme et les animaux par l'inoculation du sang au cobaye ou par l'hémoculture de Löwenstein, que la présence du bacille de Koch dans la circulation sanguine est intermittente.

A. Boquet a montré avec J. Valtis, que les bacilles tuberculeux inoculés sous la peau du cobaye à la dose de 0 milligr. 01, pénètrent tout d'abord dans la circulation lymphatique et qu'ils n'empruntent la voie sanguine que d'une manière accidentelle, spécialement dans la première phase de l'infection. A. Saenz, qui a effectué 500 hémocultures chez des malades tuberculeux, n'a eu que 3,2 p. 100 de résultats positifs pour le bacille de Koch. A part Löwenstein, la plupart des expérimentateurs qui ont étudié la bacillémie par la méthode de cet auteur, qui, d'après Saenz et Costil est presque aussi sensible que l'inoculation au cobaye, ont obtenu des résultats analogues.

Depuis que nous avons montré, avec J. Valtis et F. Van Deinse, qu'il est possible, par la méthode des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch, de mettre en évidence le virus tuberculeux chez des cobayes préalablement inoculés avec un produit suspect, alors que l'inoculation seule de ce produit à cet animal et que son ensemencement sur les milieux à l'œuf ont donné des résultats négatifs, nous avons cherché à nous rendre compte si, par cette méthode nouvelle plus sensible, la bacillémie ne se révélerait pas plus fréquente.

J. Beerens a pu réaliser cette étude dans notre laboratoire avec le sang de 14 malades tuberculeux et prouver par ce procédé l'existence de la bacillémie dans des cas où l'inoculation seule ne l'avait pas révélée.

Nous avons poursuivi nous-mêmes des recherches semblables sur le cobaye tuberculeux dans les expériences suivantes.

Le 27 octobre 1933, plusieurs cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar... Leur sang est prélevé stérilement à la seringue par ponction cardiaque sept heures, un, trois, sept, quinze, vingt-cinq, vingt-neuf, soixante-dix-sept et quatre-vingt-quatre jours après cette inoculation et injecté à la dose de 2 cent. cubes sous la peau de la cuisse droite de 5 cobayes, dont 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires de 1 cent. cube d'extrait acétonique (correspondant à 1 centigramme de corps microbiens secs).

EXPÉRIENCE I. — 5 cobayes reçoivent, le 27 octobre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé sept heures après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Le 11 décembre, les cobayes traités et les cobayes témoins sont éprouvés par injection intradermique de tuberculine. Les cobayes traités seuls réagissent faiblement.

Ces derniers sont sacrifiés le 9 janvier 1934. On constate une légère hypertrophie de leurs ganglions sous-lombaires droits et trachéo-bronchiques. Bien qu'on n'y trouve pas de bacilles de Koch, ces ganglions sont broyés, traités par l'acide sulfurique,ensemencés sur le milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Cet ensemencement et cette inoculation sont restés négatifs.

Les cobayes témoins sont sacrifiés les 15 et 27 février. L'un ne présente aucune hypertrophie ganglionnaire. Une granulation suspecte sur un poumon ne contient pas de bacilles acido-résistants. L'autre a ses ganglions inguinaux et trachéo-bronchiques légèrement hypertrophiés, mais on ne réussit pas à y déceler la présence de bacilles.

EXPÉRIENCE II. — 5 cobayes reçoivent, le 28 octobre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé vingt-quatre heures après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Un cobaye témoin meurt prématurément.

Le 11 décembre, les cobayes traités réagissent positivement à une intradermo-réaction tuberculinique. Chez le cobaye témoin survivant, la même réaction est négative.

Les cobayes sont sacrifiés le 12 janvier. Un n'a aucune hypertrophie ganglionnaire, ni aucune lésion. Les deux autres ont leurs ganglions inguinaux

et sous-lombaires droits et leurs ganglions trachéo-bronchiques légèrement hypertrophiés. La rate de l'un d'eux est granuleuse. Bien que la recherche des bacilles de Koch y soit demeurée négative, ces ganglions et cette rate sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes.

Trois semaines après, les colonies à aspect rugueux d'un bacille acido-résistant se développent sur les tubes ensemencés. Les cobayes inoculés en même temps, sacrifiés six semaines après l'inoculation, sont tuberculeux.

Le 1^{er} mars, le cobaye témoin survivant est éprouvé à la tuberculine par intra-dermo-réaction et donne une réaction positive. Il est sacrifié le 23 mars, six mois après son inoculation. Dans son ganglion sous-lombaire droit légèrement hypertrophié, on ne trouve pas de bacilles. Ce ganglion, ainsi que les ganglions trachéo-bronchiques et la rate sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Cet ensemencement et cette inoculation sont restés négatifs.

EXPÉRIENCE III. — 5 cobayes reçoivent, le 30 octobre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé trois jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Un mois après, un cobaye traité et un cobaye témoin meurent sans lésions.

Le 11 décembre, les deux cobayes traités survivants réagissent à l'intra-dermo-réaction tuberculinique par un léger érythème. Le cobaye témoin ne réagit pas.

Le 9 janvier 1934, la même réaction devient légèrement positive chez ce dernier.

Les deux cobayes traités sont sacrifiés le 12 janvier. Leurs ganglions inguinaux et sous-lombaire droits sont légèrement hypertrophiés. L'un d'eux présente un abcès de la cuisse. On ne trouve pas de bacilles dans les ganglions et dans le pus de cet abcès. Ils sont traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Cet ensemencement et cette inoculation sont restés négatifs.

Le cobaye témoin réagit encore légèrement à la tuberculine le 9 février. Il est sacrifié le 23 mars suivant. Dans son ganglion sous-lombaire droit légèrement hypertrophié et dans sa rate granuleuse, on ne trouve pas de bacilles. Ce ganglion et cette rate sont broyés et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Ceux-ci, morts six semaines après d'une infection intercurrente, ne présentent aucune lésion tuberculeuse.

EXPÉRIENCE IV. — 5 cobayes reçoivent, le 3 novembre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé sept jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche Bar.; 3 sont traités par des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Le 11 décembre, les cobayes traités et les cobayes témoins réagissent positivement à une intradermo-réaction tuberculinique. Sacrifiés le 26 janvier 1934, ils présentent des lésions des ganglions et de la rate qui contiennent des bacilles de Koch.

EXPÉRIENCE V. — 5 cobayes reçoivent, le 10 novembre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé quinze jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine

Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Un cobaye traité et un cobaye témoin meurent prématurément. Tous les autres réagissent positivement à la tuberculine le 9 janvier. Ils meurent peu après d'une infection intercurrente avec une hypertrophie des ganglions inguinaux et sous-lombaires droits qui contiennent de rares bacilles de Koch.

EXPÉRIENCE VI. — 5 cobayes reçoivent, le 21 novembre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé vingt-cinq jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Un cobaye témoin meurt prématurément. Les cobayes traités réagissent par un léger épaissement de la peau à une intradermo-réaction tuberculinique pratiquée le 9 janvier 1934. Le cobaye témoin survivant ne réagit pas.

Les cobayes traités sont sacrifiés les 17 et 24 janvier et le 24 mars suivants. Leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits sont très légèrement hypertrophiés. Ces ganglions et les rates sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Cet ensemencement et cette inoculation ont donné des résultats négatifs.

Le cobaye témoin, sacrifié le 23 mars, n'a pas de lésions.

EXPÉRIENCE VII. — 5 cobayes reçoivent, le 25 novembre 1933, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé vingt-neuf jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Un cobaye traité meurt prématurément.

Le 26 janvier 1934, les cobayes traités réagissent positivement à une intradermo-réaction tuberculinique. Chez les cobayes témoins, cette réaction est négative.

Un des cobayes traités est sacrifié le 30 janvier. Ses ganglions inguinaux et sous-lombaires droits, du volume d'un petit pois et ramollis, contiennent des bacilles de Koch. Ils sont broyés, traités par l'acide sulfurique, ensemencés sur milieu de Löwenstein et inoculés sous la peau de 5 cobayes. Des colonies à aspect rugueux d'un bacille acido-résistant se sont développées sur les tubes ensemencés. Les cobayes inoculés en même temps sont devenus tuberculeux.

Le second cobaye traité, sacrifié le 27 février, présente un ganglion sous-lombaire droit hypertrophié dans lequel on ne trouve pas de bacilles de Koch.

Les cobayes témoins, éprouvés à la tuberculine le 19 mars, ne réagissent pas. Sacrifiés le 12 avril, ils ne présentent aucune hypertrophie ganglionnaire ni aucune lésion.

EXPÉRIENCE VIII. — 5 cobayes reçoivent, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé soixante-dix-sept jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye de 0 milligr. 001 de la souche humaine Bar.; 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch. Deux cobayes traités meurent prématurément. Le troisième cobaye traité et les deux cobayes témoins, sacrifiés deux mois et demi après l'inoculation ne présentent aucune lésion.

EXPÉRIENCE IX. — 5 cobayes reçoivent, sous la peau de la cuisse droite, 2 cent. cubes de sang prélevé quatre-vingt-quatre jours après l'inoculation sous-cutanée à un cobaye d'un pus tuberculeux contenant la même souche que celle employée dans les expériences précédentes. 3 sont traités par des injections bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de Koch, 2 sont conservés comme témoins. Les 3 cobayes traités ont, cinquante-deux jours après l'inoculation, de gros ganglions inguinaux.

L'un d'eux est sacrifié. Ses ganglions inguinaux et sous-lombaires droits sont hypertrophiés. Il présente un abcès intramusculaire de la cuisse droite. Ces ganglions qui contiennent des bacilles de Koch, sont broyés, traités par l'acide sulfurique etensemencés sur milieu de Löwenstein. Les cobayes témoins, trois mois après leur inoculation, ont une intradermo-réaction à la tuberculine négative; ils sont alors sacrifiés et ne présentent aucune lésion.

L'ensemencement de ces ganglions bacillifères a donné des colonies de bacilles tuberculeux d'aspect rugueux.

En résumé, les résultats ont été les suivants :

INTERVALLE entre l'inoculation virulente et la prise de sang	RÉSULTATS chez les cobayes inoculés avec le sang et non traités par l'extrait acétonique de BK	RÉSULTATS chez les cobayes inoculés avec le sang et traités par l'extrait acétonique de BK
	—	—
7 heures	0	0
24 heures	0	+
3 jours	0	0
7 jours	+	+
15 jours	+	+
25 jours	0	0
27 jours	0	+
77 jours	0	0
84 jours	0	+

Nous avons donc obtenu, par l'inoculation seule, 7 résultats négatifs et 2 résultats positifs pour les prélèvements de sang effectués le septième et le quinzième jour après l'infection des cobayes.

Pendant les périodes où l'inoculation seule a donné des résultats négatifs (avant le septième jour et après le quinzième jour), nous avons eu 3 résultats positifs de plus, l'un à la vingt-quatrième heure, le second le vingt-neuvième jour, le troisième le quatre-vingt-quatrième jour chez des cobayes qui, inoculés avec les mêmes échantillons de sang, ont été soumis à des injections sous-cutanées répétées d'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Dans ces trois cas, les cobayes inoculés avec le sang et traités réagissaient positivement à une intradermo-réaction tuberculi-

nique; dans le premier cas, leurs ganglions inguinaux et sous-lombaires droits étaient hypertrophiés, la rate granuleuse, mais il n'a pas été possible d'y déceler des bacilles de Koch, quoique leur ensemencement sur milieu de Löwenstein ait donné une culture rugueuse de bacilles tuberculeux virulents pour le cobaye.

Dans le deuxième cas, un cobaye inoculé avec le sang et traité avait un ganglion inguinal et sous-lombaire droits du volume d'un petit pois, ramollis, dont le pus contenait des bacilles de Koch et a donné une culture rugueuse de bacilles tuberculeux virulents pour le cobaye. Dans le troisième cas, un cobaye inoculé avec le sang et traité présentait une hypertrophie des ganglions inguinaux et sous-lombaires droits dans lesquels on a trouvé des bacilles tuberculeux qui ont été isolés sur milieu de Löwenstein. Leur culture rugueuse s'est montrée virulente pour le cobaye.

Dans le premier cas, le cobaye témoin a réagi à la tuberculine très tardivement, cinq mois après l'inoculation de sang. Sacrifié six mois après l'inoculation, on n'a pas trouvé de bacilles de Koch dans ses ganglions. L'ensemencement de ces derniers sur milieu de Löwenstein et leur inoculation à 5 cobayes est restée négative.

Les cobayes témoins des deux autres cas n'ont jamais réagi à la tuberculine.

Caractères des bacilles tuberculeux isolés.

La souche qui a été utilisée dans ces expériences a été isolée d'une adénite humaine. Inoculée dans la veine du lapin à la dose de 1 milligramme, elle ne lui donne, au bout de quatre à six semaines, que quelques rares granulations pulmonaires. A la dose de 0 milligr. 01 par la même voie, on ne constate en général aucune lésion chez cet animal après la même période. Il s'agit donc d'un bacille de type humain. Cette souche est d'une virulence moyenne pour le cobaye. Cinq semaines après une inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 001, cet animal présente de grosses lésions ganglionnaires et de nombreux tubercules sur la rate.

1° PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA SOUCHE ISOLÉE DU SANG
D'UN COBAYE VINGT-QUATRE HEURES APRÈS SON INFECTION.

Le pouvoir pathogène de cette souche dont les colonies se présentent sous l'aspect rugueux, a été étudié chez le cobaye, le lapin et la poule.

EXPÉRIENCE. — Le 26 mars 1934, 2 cobayes reçoivent sous la peau 1 milligramme de cette souche.

Ils meurent les 10 et 14 avril avec de grosses lésions ganglionnaires et des tubercules sur la rate.

Deux autres cobayes reçoivent sous la peau, à la même date, 0 milligr. 01 de cette souche. Ils meurent les 16 et 18 avril avec des lésions ganglionnaires et des granulations sur la rate.

EXPÉRIENCE. — 2 lapins reçoivent dans la veine, le 26 mars 1934, 1 milligramme de cette souche. Ils sont sacrifiés le 26 avril. L'un présente un semis de petites granulations confluentes sur les deux poumons et quelques granulations sur la rate, l'autre une tuberculose massive des poumons avec une rate hypertrophiée. L'ensemencement sur milieu de Löwenstein de ces derniers organes a permis d'en isoler des colonies de bacilles tuberculeux à aspect lisse.

Les coupes histologiques des poumons du premier lapin, effectuées par notre collègue M. Bablet, que nous tenons à remercier, montrent des follicules tuberculeux typiques à centre caséux avec cellules géantes très nombreuses, souvent rapprochées et tendant à la confluence. Dans le caséum, on trouve de rares bacilles longs et grêles.

A la même date, 2 autres lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de la même souche.

Un, sacrifié le 4 mai, présente de nombreuses granulations sur les deux poumons, et deux tubercules sur le rein droit. A l'examen histologique, ces poumons contiennent des blocs épithélioïdes à centre parfois caséux, englobant de nombreuses alvéoles et quelques bronches. Les cellules géantes sont rares.

EXPÉRIENCE. — 2 poules inoculées dans la veine le 26 mars 1934 avec 1 milligramme et 0 milligr. 01 de cette souche, sont sacrifiées le 1^{er} mai. Elles n'ont aucune lésion.

Nous venons de voir que l'ensemencement des poumons du lapin qui a reçu dans la veine 1 milligramme de cette souche, a donné sur le milieu de Löwenstein des colonies à aspect lisse qui, au réensemencement suivant, ont repris l'aspect rugueux.

Cette culture lisse, inoculée sous la peau du cobaye à la dose de 1 milligramme et de 0 milligr. 01, l'a tuberculisé.

EXPÉRIENCE. — Le 8 juin, 1 lapin reçoit dans la veine 1 milligramme de cette variante lisse. Il meurt vingt jours après avec une congestion des poumons qui contiennent d'assez nombreux bacilles.

A la même date, 2 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette variante lisse. L'un d'eux, sacrifié le 26 juillet, présente 15 à 20 granulations sur chaque poumon, et 3 à 4 sur chaque rein. Les granulations sont nombreuses sur la rate. L'autre meurt le 25 octobre suivant. Il présente d'énormes lésions confluentes sur les poumons et quelques tubercules sur la rate et les reins, ces derniers en chou-fleur.

Deux lapins qui ont reçu dans la veine, le 8 juin, 0 milligr. 001 de cette variante lisse, sont sacrifiés le 25 juillet. Ils n'ont que 4 ou 5 granulations à la base de chaque poumon.

EXPÉRIENCE. — 2 poules reçoivent, le 8 juin, dans la veine 1 milligramme et 0 milligr. 01 de cette variante lisse. Sacrifiées le 26 juillet, leurs organes ne présentent aucune lésion et ne contiennent pas de bacilles.

Après sept mois de réensemencements sur pomme de terre glycinée, la souche à colonies rugueuses, isolée du sang de cobaye, conserve le même pouvoir pathogène pour le lapin.

EXPÉRIENCE. — Le 4 septembre 1934, 2 lapins reçoivent dans la veine 1 milligramme de cette souche. Ils meurent le 3 et le 15 octobre avec une granulie pulmonaire presque confluyente.

EXPÉRIENCE. — Le 4 septembre 1934, 2 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche.

Un est sacrifié le 4 octobre. Il présente des tubercules presque confluentes. L'autre meurt le 3 décembre avec de nombreux tubercules pulmonaires et un tubercule sur un rein.

EXPÉRIENCE. — Le 7 octobre 1934, 2 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 001 de cette souche.

Un est sacrifié le 15 novembre. Il ne présente que quelques granulations sur les poumons.

Le second, sacrifié le 21 décembre, n'a que de rares tubercules sur les poumons. Les autres organes sont normaux.

EXPÉRIENCE. — Le 9 octobre 1934, 1 lapin reçoit dans la veine 0 milligr. 0001 de cette souche.

Il est sacrifié le 21 décembre et ne présente que 2 granulations sur les poumons.

2° PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES DE LA SOUCHE ISOLÉE DU SANG D'UN COBAYE VINGT-NEUF JOURS APRÈS SON INFECTION.

Cette souche présente pour le cobaye le même pouvoir pathogène que la souche originelle et que celle isolée du sang d'un cobaye vingt-quatre heures après son infection. Comme cette dernière, elle n'a aucun pouvoir pathogène pour la poule, mais elle donne, par la voie veineuse, des lésions au lapin.

EXPÉRIENCE. — Le 26 mars, 2 lapins reçoivent dans la veine 1 milligramme de cette souche. Sacrifiés le 27 avril, l'un présente un semis de petites granulations assez nombreuses sur les deux poumons. La rate est hypertrophiée. L'autre a des granulations moins nombreuses sur les poumons, avec une rate très hypertrophiée. L'ensemencement de ces poumons sur milieu de Löwenstein a donné des colonies à aspect rugueux.

A la même date, 2 lapins reçoivent dans la veine 0 milligr. 01 de cette souche. Ils sont sacrifiés le 4 mai et n'ont que 4 à 5 tubercules à la base de chaque poumon sans autres lésions.

Cette souche, trois mois après son isolement du sang, ne donne plus de lésions au lapin par inoculation intraveineuse de 1 milligramme et 0 milligr. 01. Sa virulence reste la même pour le cobaye.

3° PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES

DE LA SOUCHE ISOLÉE DU SANG D'UN COBAYE

QUATRE-VINGT-QUATRE JOURS APRÈS SON INFECTION.

Cette souche a, pour le cobaye, le même pouvoir pathogène que les souches précédentes.

Les lapins inoculés dans la veine avec 0 milligr. 01 présentent, au bout de cinq à six semaines, de très nombreuses granulations sur les poumons et le foie, rares sur la rate et sur les reins.

D'après l'examen histologique de M. Bablet, les poumons présentent des lésions exsudatives étendues du type pneumonie caséuse, les bronches sont desquamées ou envahies, les bacilles acido-résistants sont peu nombreux, disséminés dans les lésions caséuses.

Le foie est congestionné et hémorragique. Il présente des nodules réactionnels histioleucocytaires à centre caséux, pas de cellules géantes.

La rate a une pulpe rouge hémorragique avec quelques îlots épithélioïdes parfois caséifiés, et avec de rares cellules géantes.

Le rein présente de la congestion et une dégénérescence cytolitique de nombreux tubes contournés, quelques follicules histiolympocytaires à centre caséux avec rares bacilles acido-résistants.

Les poules inoculées dans la veine avec 1 milligramme et 0 milligr. 01 de ces bacilles et sacrifiées au bout de six semaines et de trois mois, n'ont présenté aucune lésion.

Après plusieurs mois de réensemencements, cette souche, inoculée au lapin par voie veineuse à la dose de 0 milligr. 01, 0 milligr. 001 et 0 milligr. 0001, lui donne les lésions suivantes :

Dose de 0 milligr. 01, cinq semaines après l'inoculation, l'animal sacrifié présente de grosses lésions pulmonaires et de nombreuses petites granulations sur le foie, rares sur la rate et les reins.

Dose de 0 milligr. 001, après cinq à sept semaines, assez nombreux tubercules pulmonaires.

Dose de 0 milligr. 0001, après sept semaines, assez nombreuses lésions pulmonaires d'aspect granulique.

Ces trois souches ont donc présenté, au moment de leur isolement, les mêmes caractères : colonies rugueuses, de bacilles virulents pour le cobaye et pour le lapin ; non pathogènes pour la poule.

Après quelques mois de réensemencements, une de ces souches a perdu sa virulence pour le lapin ; les deux autres l'ont conservée.

Conclusions.

Il ressort de ces expériences qu'on peut, dans certains cas, par la méthode des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch, révéler la présence du virus tuberculeux dans le sang d'un animal tuberculeux alors que l'inoculation du même produit au cobaye est restée négative.

Comme dans les expériences de J. Beerens, les souches de bacilles tuberculeux à colonies rugueuses qui ont été obtenues par ensemencement des lésions de ces cobayes sur milieu de Löwenstein, sont virulentes pour cet animal et n'ont aucun pouvoir pathogène pour la poule.

Elles déterminaient, au moment de leur isolement, par inoculation intraveineuse au lapin à la dose de 1 milligramme et de 0 milligr. 01, l'apparition sur les poumons et souvent sur les autres organes, des lésions granuliques du type Yersin. A la dose de 0 milligr. 001, les lésions sont moins nombreuses.

Deux de ces souches, quoique de provenance humaine, conservent encore, après plusieurs mois de réensemencements sur pomme de terre glycinée, des caractères pathogènes pour le

lapin, mais les lésions observées après inoculation intraveineuse des mêmes doses n'ont plus le même aspect granulique. L'autre souche a perdu sa virulence pour le lapin après un certain nombre de réensemencements.

Comme l'un de nous l'a constaté avec J. Valtis, le pouvoir pathogène de ces souches pour le lapin ne peut pas s'expliquer par une modification de leurs propriétés biologiques sous l'influence de l'extrait acétonique de bacilles de Koch. Il ne peut non plus s'agir de bacilles virulents préexistant dans l'organisme des cobayes ou provenant du milieu extérieur, d'après les expériences de contrôle que nous avons faites.

Il semble donc que les caractères de ces souches proviennent de l'état sous lequel le virus tuberculeux est révélé dans le sang par l'extrait acétonique.

L'un de nous a constaté, avec J. Valtis, F. Van Deinse et J. Beerens, que les résultats sont les mêmes lorsqu'on opère avec des filtrats de produits pathologiques sur bougie Chamberland.

Quelle que soit la nature des éléments filtrables du virus tuberculeux, on peut supposer que les injections répétées des substances ciro-graisseuses bacillaires, par leur influence activante, mettent en évidence le virus tuberculeux sous une forme qui n'a pas la virulence du bacille de Koch et qui, par ce fait, ne peut pas être décelé par l'inoculation au cobaye, méthode considérée jusqu'à présent comme la plus sensible.

BIBLIOGRAPHIE

- BEERENS (J.). *Ces Annales*, **52**, avril 1934, p. 406.
BOQUET (A.) et VALTIS (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **401**, 1929, p. 644; **403**, 1930, p. 1229.
NÈGRE (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **415**, 1934, p. 283.
NÈGRE (L.) et VALTIS (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **45**, 18 octobre 1930, p. 183; *Ces Annales*, **46**, juin 1931, p. 587; **51**, novembre 1933.
NÈGRE (L.), VALTIS (J.) et VAN DEINSE (F.). *C. R. Soc. de Biol.*, **410**, 25 juin 1932 et t. **413**, 14 janvier 1933. *La Presse Médicale*, 23 septembre 1933.
NÈGRE (L.), VALTIS (J.), VAN DEINSE (F.) et BEERENS (J.). *La Presse Médicale*, n° 103, 24 décembre 1932.
SAENZ (A.). *La Presse Médicale*, n° 97, 1933.
VALTIS (J.) et MISSIEWICZ. *C. R. Soc. de Biol.*, **401**, 1928, p. 7.

VALEUR IMMUNISANTE DU BCG ET DES VACCINS TUÉS POUR LE COBAYE

par M. JULES DARANYI,

Professeur d'hygiène publique à l'Université de Budapest.

Robert Koch avait déjà cherché à provoquer l'immunisation au moyen de tuberculine ou encore de bacilles morts. Mais l'inoculation préalable de tuberculine, comme nous le savons depuis les expériences d'Arloing, Trudeau, Möllers, etc., n'exerce pas une influence favorable sur l'immunité contre la tuberculose. Behring choisit une meilleure méthode et essaya d'immuniser des veaux en leur inoculant des bacilles de la tuberculose humaine, peu virulents pour les bovins (« boovaccin »). Römer a montré qu'on ne peut immuniser contre la tuberculose ni au moyen d'extraits de bacilles, ni par des bacilles morts ou non virulents, mais seulement au moyen de bacilles de faible virulence. Il y a immunité spécifique tant qu'il y a tissu tuberculeux. Calmette estimait suffisante, pour maintenir l'immunité, la symbiose de son bacille de faible virulence, le BCG, avec le tissu lymphatique de l'intestin. Toutes ces recherches ont eu pour effet d'introduire la notion de « l'immunité par infection » (Infektionsimmunität). Néanmoins, l'efficacité de l'inoculation des bacilles morts est encore soutenue par des savants : Langer (*D. m. W.*, 1913-1925) recommande le vaccin mort, Raw (*Brit. med. J.*, 1925, p. 744), le vaccin tué avec ménagement ; Maragliano (*Ann. Ist. Maragliano*, III, 3, 223, 1933) affirme aujourd'hui encore que l'immunisation peut être produite par des bacilles morts et non pas seulement par des bacilles vivants. Mais les recherches ultérieures n'ont pu confirmer cette thèse. G. Kirchner (*Ces Annales*, août 1929), qui fit des expériences d'immunisation au moyen de bacilles tués par la chaleur, en effectuant l'épreuve sous-cutanée au moyen de bacilles bovins virulents, a constaté que les altérations tuberculeuses des cobayes traités étaient de même étendue que celles des témoins.

Chez les cobayes, par contre, qui avaient reçu des inoculations sous-cutanées de BCG, les lésions à la suite d'une infection ultérieure, étaient beaucoup moindres et se présentaient plus tard que chez les témoins. Chez les singes, Kirchner n'a pas trouvé d'aussi bons résultats. Avec le vaccin tué de Langer, Seligmann et Gutfeld (*Zit. nach Mecklenburg. Kl. W.*, 1929-1934) n'ont pu non plus provoquer ni allergie, ni immunité sur des cobayes. De même, selon les expériences de Lange (*Ergebn. d. ges. Tb. forschg.*, Bd. 1), après le traitement par des bacilles morts, il se manifeste une résistance bien moindre qu'avec les bacilles de faible virulence. La plupart des expérimentateurs opérant sur les animaux reconnaissent au vaccin de faible virulence, au BCG, une certaine action favorable.

Calmette se livra, le premier, à des expériences consistant à faire absorber du BCG à de jeunes cobayes et, au bout de trois mois, des bacilles virulents. D'une manière générale, les animaux ainsi inoculés vécurent plus longtemps et présentèrent des altérations moindres que celles des témoins (Calmette : *La vaccination préventive*, p. 111).

Uhlenhut (*Ztschr. f. Immunforschg.*, 1930, Bd. 63) a confirmé, par quelques expériences sur des bovins, que le vaccin de Calmette avait un certain effet favorable. Sur 6 animaux (exposés dans une étable à la contamination naturelle), 2 restèrent sains ; quant aux autres, ils présentèrent des altérations moindres que celles des témoins (6) qui succombèrent tous à une grave tuberculose à marche rapide. Mais il obtint un résultat semblable à celui du vaccin de Calmette par l'inoculation préventive d'une souche de laboratoire dont la virulence était réduite dans une grande mesure. Les recherches de Noury et Beerens sur des cobayes donnèrent également de bons résultats (*C. R. Soc. Biol.*, 1932). Brunzema et Kaufmann (*Ztschr. f. Hyg.*, Bd. 115, 1933) obtinrent un résultat assez favorable en inoculant du BCG à des cobayes, des moutons et des bovins qui furent ensuite infectés (l'étendue des altérations fut environ deux fois moins grande que chez les sujets témoins). Boquet (*C. R. Soc. Biol.*, 1931 et 1932) se livra également à des expériences consistant en inoculation de bacilles tuberculeux à des cobayes, soumis trois à quatre semaines plus tard à une superinfection par inoculation intratesticulaire, sous-cutanée et endodermique, et fit des

examens histologiques très précis pour étudier l'influence de l'inoculation sur la superinfection. Il constata qu'à la seconde inoculation, la dispersion des bacilles virulents s'effectue avec un notable retard, c'est-à-dire que la résistance des animaux à la superinfection s'accroît. C'est ce qui, en tout cas, ne contredit pas nécessairement les expériences de Krause, Peters, Debré, etc., suivant lesquels les tubercules se développent plus vite à la superinfection, s'ulcèrent plus promptement et présentent davantage une tendance à la guérison; ce qui correspond d'ailleurs à la réaction allergique des tissus, depuis longtemps connue, et au phénomène de Koch. Rupilius (*Beitrg. z. Klin. d. Tbc.*, 1933.) compare surtout la durée de la vie chez les cobayes vaccinés et infectés et chez les cobayes témoins (les sujets traités au BCG vécurent en moyenne deux cent quatre-vingt-dix-huit jours, les témoins en moyenne cent quarante-six). Birkhaug (*Am. Rev. of Tbc.*, 27, 1933), en faisant absorber du BCG à des cobayes nouveau-nés, ne constata aucun effet immunisant, contrairement au résultat favorable obtenu par l'inoculation ordinaire (infection sous-cutanée ou intracutanée). Cette résistance est, selon lui, environ le double de celle des témoins. Nègre, par contre (*Presse méd.*, 1934, p. 1924), dans ses récentes expériences, a trouvé chez des cobayes ayant absorbé du BCG et soumis ensuite à une infection intra-oculaire, un processus plus lent et moins étendu que chez les sujets témoins. Mais il a utilisé pour l'infection une souche de moindre virulence. Bruno Lange, en expérimentant sur des veaux nouveau-nés auxquels il avait fait absorber du BCG, n'est pas arrivé non plus à des résultats concluants. Chez le veau l'inoculation sous-cutanée a donné des résultats un peu meilleurs. Mais, dans la tuberculose, il ne peut guère être question d'immunité absolue. Dans la plupart des recherches, on n'a pris pour critère de l'immunité que le fait que les animaux restaient ou non en vie, qu'ils mouraient plus tôt ou plus tard, le début et l'extension des processus.

Nos expériences sur des animaux se différencient des précédentes par le grand nombre (400) des cobayes employés, ainsi que par le mode de l'infection par voie aérogène, par pulvérisation (infection par « spray »). Nous avons procédé à l'inoculation de bacilles vivants, mais de faible virulence (BCG) et de bacilles

morts sur divers cobayes. Nous nous proposons de voir par quelles sortes de bacilles est produite l'allergie qui exerce le plus d'influence sur l'immunité des tissus. Afin de reproduire les conditions naturelles et pour mieux mettre en évidence la résistance des tissus, nous avons procédé à la superinfection par pulvérisation des cobayes vaccinés au moyen de bacilles virulents. Le professeur Guérin, de l'Institut Pasteur de Paris, a bien voulu mettre à notre disposition la souche BCG. Chaque

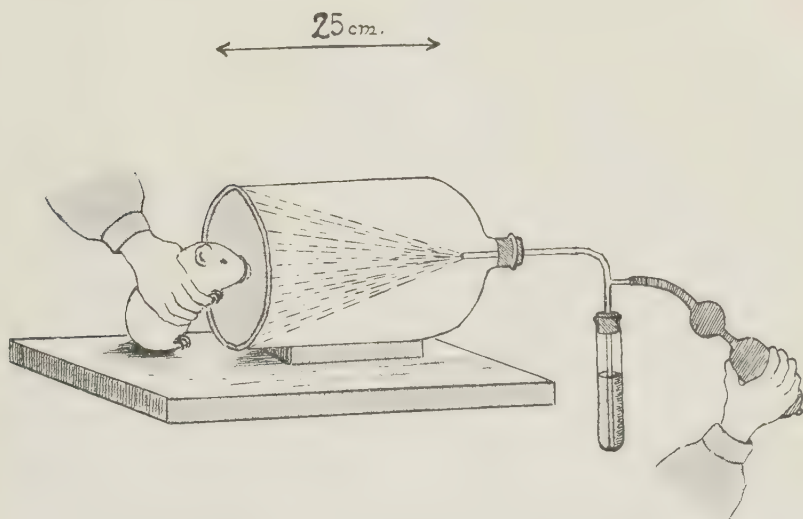


FIG. 1.

cobaye a reçu la quantité d'une anse normale de platine, émulsionnée dans 1 cent. cube de solution physiologique. Comme vaccin mort, nous avons employé une souche bovine, à raison d'une masse humide de 40 milligrammes dans une solution physiologique au sublimé de 20 cent. cubes (1 : 250 sublimé 1 partie, 19 parties vaccin = solution de sublimé à 1 : 5.000). Dans une série d'expériences, nous avons en outre employé, chez la moitié des animaux, du vaccin au phénol, c'est-à-dire des bacilles bovins tués en les exposant pendant une heure à une température de 60° et conservés ensuite dans une solution physiologique avec 1/2 p. 100 de phénol. La quantité inoculée était de 2 milligrammes environ. Les animaux vaccinés plus de deux mois avant l'infection subirent deux inoculations à une

semaine d'intervalle. L'endroit des vaccinations était la partie inférieure de l'abdomen, où l'inoculation cause tout au plus une faible altération locale. Nous avons procédé à l'infection pour tous les animaux simultanément en les soumettant pendant un temps égal à la pulvérisation de la même souche ou, dans les grandes expériences, d'un mélange égal de souches bovines et humaines, c'est-à-dire dans des conditions complètement identiques. La pulvérisation était effectuée pendant dix secondes dans une cloche de verre fermée à l'un des côtés par une toile à travers une ouverture de laquelle on passait le nez du cobaye; à l'autre extrémité, le pulvérisateur était appliqué à la distance de 25 centimètres environ (fig. 1).

Les animaux furent tués deux mois ou trois mois après l'infection. A la dissection, le lieu de l'inoculation, les ganglions trachéo-bronchiques, le ganglion de Virchow, le foie, la rate et les poumons ont été examinés et les tubercules comptés : à cet effet, nous avons pris pour unité un amas de tubercules de la grosseur d'une tête d'épingle pour comparer à cette unité les autres valeurs et déterminer ensuite la valeur moyenne à l'intérieur d'un groupe. En dehors des cobayes inoculés, 7 cobayes sains, non inoculés, servant de témoins, ont également été traités par la pulvérisation. Les tableaux ci-dessous montrent les résultats de nos expériences :

TABLEAU I.

INTERVALLE entre l'inoculation et la pulvérisation en semaines	INOCULATION	NOMBRE d'animaux	NOMBRE de tubercules		
			Foie	Rate	Poumons
4	Vaccin de bacilles humains tués. A.	71	—		7-8
4	Vaccin de bacilles humains tués. B.	72	8	8 8	50-60
4	BCG.	73	5	1	2
3	Vaccin de bacilles humains tués. A.	23	9		4
3	Vaccin de bacilles humains tués. B.	22	5	8 8	10
3	BCG.	35	2	—	3
2	Vaccin de bacilles humains tués. A.	25	15	4	17
2	Vaccin de bacilles humains tués. B.	27	4	8 8	38
2	BCG.	28	2	—	22
1	Vaccin de bacilles humains tués. A.	70	8	8 8	70
1	Vaccin de bacilles humains tués. B.	83	30-40	8 8 8	20
1	BCG.	94	8	8 8 8	16

Sujets témoins .	Infection par pulvérisation sans inoculation préalable.	50	10	8	40-50
		80	8	8	10
		81	5	8	15-16

Il résulte des tableaux ci-dessus que l'inoculation tant de BCG que de bacilles morts est loin de donner une immunité absolue.

Cependant on peut constater qu'à la suite des inoculations de BCG, le processus est de moindre étendue. L'inoculation de bacilles morts ne donne nullement cet effet favorable; il semble même, selon le tableau II, qu'en cas d'inoculations pratiquées de deux semaines à deux mois avant l'infection, on observe plutôt une influence défavorable. Dans la seconde

TABLEAU II.

INTERVALLE entre l'inoculation et la pulvérisation	INOCULATION	NOMBRE D'ANIMAUX	GANGLIONS inguinaux	GANGLIONS du hile	ÉTENDUE du processus (unité = tête d'épingle)		
					Ficé	Rate	Poumons
6 mois . . .	BCG.	7	—	27	1	5	15
6 mois . . .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	9	—	22	0,5	16	44
4 mois . . .	BCG.	9	—	41	59	39	178
4 mois . . .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	9	—	40	0,3	10	7½
2 mois . . .	BCG.	10	—	22	— — —	7	20
2 mois . . .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	10	—	21	62	112	164
5 semaines .	BCG.	10	—	11	30	4	30
5 semaines .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	10	3	24	31	28	38
4 semaines .	BCG.	10	—	29	4	17	38
4 semaines .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	10	6	29	80	22	100
3 semaines .	BCG.	10	—	17	72	15	52
3 semaines .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	10	5	29	49	57	123
2 semaines .	BCG.	10	—	5	0,5	— —	20
2 semaines .	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	9	5	19	131	46	100

expérience en masse, il y eut infection mixte (humaine et bovine), ce qui a peut-être modifié le résultat. Si nous avons eu recours à l'infection mixte, c'est à proprement parler parce que les souches humaines utilisées n'étaient pas toujours d'une virulence suffisamment sûre. En ce qui concerne la phase dite négative, elle apparaît tout au plus (deux à six semaines avant l'infection) dans le cas d'inoculation de bacilles morts et surtout dans le cas de la forte infection signalée au tableau II. Dans l'infection *par le seul type humain*, selon le tableau I, *l'effet du BCG est meilleur*, en général, que dans l'infection mixte. Dans cette expérience, le traitement par les bacilles morts montre également un effet heureux, mais plus faible qu'avec le BCG. Ces dernières expériences n'ayant eu lieu qu'à court intervalle (l'infection a été effectuée un mois après l'inoculation)

TABLEAU III.

INTERVALLE entre l'inoculation et la pulvérisation en semaines	INOCULATION	NOMBRE D'ANIMAUX	GANGLIONS inguinaux	GANGLIONS du hile	FOIE	RATE	POUMONS
1	BCG.	6	2	9	11	10	82
1	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	6	2	23	189	59	65
2	BCG.	6	6	6	86	16	93
2	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	6	—	8	84	19	58
3	BCG.	6	—	13	21	13	107
3	Vaccin de bacilles humains et bovins tués.	6	—	8	9	13	46

Sujets témoins. (Sans inoculation préalable.)	MODE D'INFECTION	NOMBRE D'ANIMAUX	GANGLIONS inguinaux	GANGLIONS du hile	FOIE	RATE	POUMONS
	Pulvérisation.	7	—	14	21	13	66

et sur un nombre assez restreint d'animaux, elles ne peuvent passer pour des preuves absolues, mais elles viennent à l'appui des résultats favorables du tableau II. En général, les altérations des ganglions trachéo-bronchiques, premiers filtres des bacilles, sont plus grandes, surtout chez les animaux inoculés depuis longtemps, que chez les sujets témoins, principalement au delà de la quatrième semaine, ce qui s'explique peut-être par le caractère plus intense de la défense. Avant de les tuer, nous avons également effectué sur les animaux des réactions intracutanées à la tuberculine, mais les résultats en étant médiocrement concluants, nous ne les avons pas portés au tableau.

Le résultat des expériences sur les animaux, s'il n'est pas très grand, affirme l'utilité du vaccin BCG. Le cobaye étant l'animal le plus sensible, l'infection artificielle par pulvérisation a chez lui un effet extrêmement accusé. Dans l'infection naturelle, il est certain qu'il entre moins de bacilles dans l'organisme. En tout cas, ces expériences ne confirment nullement celles de Nobel (sur les cobayes) et de Nohlen (sur les singes) qui n'ont constaté aucune espèce d'immunisation par le BCG.

Une constatation intéressante (tableau II *b*) est que *l'inoculation de BCG dans un organisme déjà infecté*, du moins dans les semaines suivant immédiatement l'infection, semble plutôt intensifier le processus, et que de la première semaine à la troisième, il semble que cette intensification s'accroisse. C'est ce qui n'apparaît pas, en revanche (après l'infection), en cas d'inoculation de bacilles morts. Levitan, Lokhoff et Kosmodemanski (cit. *Journ. of the Am. Med. Assoc.*, 1931) n'ont pas vu de différence par rapport aux sujets témoins, en inoculant du BCG à des cobayes et des lapins préalablement infectés, mais l'infection, la date et le mode d'inoculation n'étaient pas les mêmes que dans nos expériences. Les expériences de ces auteurs ne prouvent pas que le traitement par le BCG *peu de temps* (une à trois semaines) après l'infection n'aggrave pas le processus.

Nos expériences justifient à leur tour la précaution à l'égard de l'inoculation de BCG chez les sujets déjà infectés. Dans ces expériences, avec le type humain seulement (tableau I), à la suite de l'infection par pulvérisation, nous avons obtenu des tubercules très uniformes et faciles à compter, tandis qu'en cas d'infection mixte (type humain et type bovin), les tubercules

ont présenté des différences de dureté très frappantes. Nous compléterons encore nos expériences dans ce sens à l'égard de l'infection mixte et de l'infection au moyen d'une souche unique.

Ce qui ressort avec certitude, tant de nos propres expériences que de celles des autres chercheurs, c'est que la vaccination par le BCG est extrêmement inférieure en efficacité à la vaccination contre la variole, c'est-à-dire de l'immunisation pour ainsi dire absolue, et qu'elle n'atteint peut-être même pas l'efficacité absolue de la vaccination contre la diphtérie, contre la fièvre typhoïde ou le choléra. Cependant, on ne peut nier un résultat favorable dans les expériences sur des animaux. Si nous pouvons, chez un animal aussi complètement dépourvu de défense contre la tuberculose que le cobaye, exercer par l'inoculation un effet tel que les progrès de l'infection, c'est-à-dire de la maladie, en soient retardés, nous avons le droit de supposer qu'une certaine défense naturelle étant donnée et en cas de contamination naturelle, beaucoup plus légère que l'artificielle, la défense contre la maladie, principalement au moyen de bacilles comme le BCG, d'une virulence très affaiblie mais vivants, est possible.

Arrivé à la fin de cette étude, je tiens à remercier M^{me} le Dr Hélène Hilko, qui a pratiqué, selon mes instructions, les inoculations en masse et les dissections des cobayes.

CONCLUSION.

Des expériences ont été faites au moyen de vaccins de bacilles de Koch et, deux semaines à six mois après l'inoculation, par l'infection aérogène (pulvérisation) de bacilles bovins et humains virulents. Les résultats ont été les suivants :

1° Les cobayes traités (2 inoculations sous-cutanées) au moyen du vaccin BCG présentent, en général, en cas d'infection par pulvérisation deux semaines à six mois après l'inoculation, des processus tuberculeux moins étendus que les sujets témoins ou les animaux traités de la même manière au moyen de bacilles de Koch morts. La phase dite négative n'apparaît guère que dans les premières semaines en cas d'inoculation de bacilles morts et de forte infection.

2° L'altération des ganglions trachéo-bronchiques, par contre,

chez les animaux traités par le vaccin BCG est, surtout après la troisième semaine, plus étendue que chez les sujets témoins. Ici, le rôle de ces ganglions peut être comparé à celui d'un filtre ou d'une digue.

3° En traitant les cobayes par le BCG *après l'infection* par pulvérisation, apparaissent progressivement au bout de une, deux et trois semaines, des altérations tuberculeuses plus graves que chez les sujets témoins et chez les animaux traités de la même manière avec des bacilles tués. Cela justifie la recommandation de Calmette de n'inoculer ce vaccin, surtout s'il s'agit d'adultes, qu'à des individus ne réagissant pas à la tuberculine, c'est-à-dire non infectés.

SUR LES VARIATIONS DES PNEUMOCOQUES CONSERVÉS EN DEHORS DE L'ORGANISME

par L. COTONI et J. POCHON.

Depuis longtemps, et en particulier dans ces dernières années, les variations microbiennes ont été l'objet de nombreuses études. Chez des bactéries diverses, Arkwright, de Kruif, Cowan, Andrewes ont montré l'existence de plusieurs variétés de colonies. Chaque variété possède en propre un faisceau de caractères morphologiques, bio-chimiques et immunologiques. Les variations des pneumocoques avaient été depuis longtemps signalées (Neufeld, Truche, Cotoni et Raphael, Friel, L. Stryker), mais elles ont été beaucoup mieux connues après les recherches fondamentales de F. Griffith (1) [1923] sur les divers types de colonies. Sous les noms de *smooth* (lisse) et *rough* (rugueux), proposés par Arkwright, dès 1921, chez d'autres espèces, on désigne donc deux états, deux « phases » du pneumocoque.

La variété S a des colonies transparentes d'aspect classique; ses cultures liquides, uniformément troubles, dissoutes par les sels biliaires, agglutinées par l'antisérum préparé avec les germes du même groupe, tuent la souris et parfois le lapin. La variété R a des colonies rugueuses; ses cultures liquides sont d'aspect grumeleux, résistent à la lyse biliaire, sont agglutinées par les sérums normaux et dépourvues de pouvoir pathogène. La variété S peut se transformer en R après passages dans des milieux additionnés d'antisérum homologue (Griffith) ou de bile (Amoss, Reimann) ou après culture à 39°. Nous avons observé le même résultat par simple vieillissement d'une culture. Pour l'histoire de ces variétés nous renvoyons aux travaux des auteurs.

(1) *Reports on Public Health and Med. Subjects, Ministry of Health*, n° 48, Londres, 1923.

Reimann (1) a observé des variations chez les échantillons de pneumocoque repiqués en série dans le bouillon, additionné ou non de bile, d'antisérum, d'optochine, et a vu apparaître un mélange de colonies S et R.

Nous désirons, pour notre part, attirer l'attention sur des variations *spontanées* du pneumocoque, variations que nous avons pu, dans certains cas observer jour par jour. Tous ceux qui ont manié des pneumocoques d'une façon suivie ont peut-être enregistré des faits analogues, qu'il n'est pas inutile de signaler aux chercheurs.

L'un de nous, avec Truche et M^{lle} Raphael (2), a signalé autrefois des variations portant sur la solubilité dans la bile et le pouvoir pathogène chez les pneumocoques conservés à la glacière par le procédé de la gélatine (3), et repiqués à plusieurs mois d'intervalle. On peut, par exemple, assister à la chute de la virulence, la solubilité demeurant parfois intacte : tel échantillon de pneumocoque, soluble et virulent (tuant la souris sous la peau à 10^{-11} cent. cube, le lapin à 10^{-7} cent. cube, le cobaye à 1 cent. cube), conserve sa solubilité pendant seize mois, tandis que baisse son pouvoir pathogène, (il ne tue plus la souris qu'à 10^{-6} cent. cube, le lapin à 10^{-2} cent. cube, et est devenu inoffensif pour le cobaye). Dans d'autres cas, la perte de la virulence peut s'accompagner de perte de la solubilité, le retour de la virulence s'accompagner du retour de la solubilité : témoin tel échantillon étudié autrefois, insoluble et peu ou pas virulent pour la souris de décembre à mars, puis devenant, en mai, soluble et virulent au point de tuer la souris sous la peau, à 10^{-6} cent. cube. Témoin encore un autre échantillon soluble et virulent pour la souris lors de son isolement de l'organisme humain, qui devient insoluble et avirulent sept mois après, puis au treizième mois soluble et virulent, définitivement insoluble et avirulent deux ans après son isolement.

Voici deux exemples plus récents de variations concernant plusieurs propriétés à la fois, étudiées à partir de *colonies isolées*. Si l'on peut nous reprocher de n'avoir pas utilisé la

(1) *J. Exp. Med.*, 1, 1925, p. 587.

(2) *Ces Annales*, 27, 1913, p. 886.

(3) *Ibid.*, 26, 1912, p. 1.

technique unicellulaire plus rigoureuse, ces faits ont été assez minutieusement observés pour être relatés.

Le pneumocoque El., du type I, est isolé en mars 1925. Il offre tous les caractères des pneumocoques virulents, tue le lapin sous la peau à 10^{-6} cent. cube et est conservé en gélatine, à la glacière, suivant notre technique habituelle, sans que ses caractères varient *pendant plus de huit ans*. En janvier 1934, c'est-à-dire près de neuf ans après l'isolement, on s'aperçoit que cet échantillon pousse agglutiné en eau peptonée glucosée (2 p. 1.000). On étudie alors de plus près la culture que nous appellerons El. 25. Elle est devenue presque insoluble dans les sels biliaries, mais tue encore, par la voie sous-cutanée, la souris à 10^{-5} cent. cube et le lapin à 10^{-1} cent. cube; centrifugée, elle est précipitée légèrement par les antisérums I et II. Comme cette culture se montre à la fois *insoluble et virulente*, on soupçonne qu'elle est constituée par un mélange de germes possédant des propriétés diverses : cette hypothèse va se trouver vérifiée.

L'ensemencement sur gélose-sang [formule de Griffith (1)] fournit en effet deux variétés de colonies (voir le tableau ci-joint).

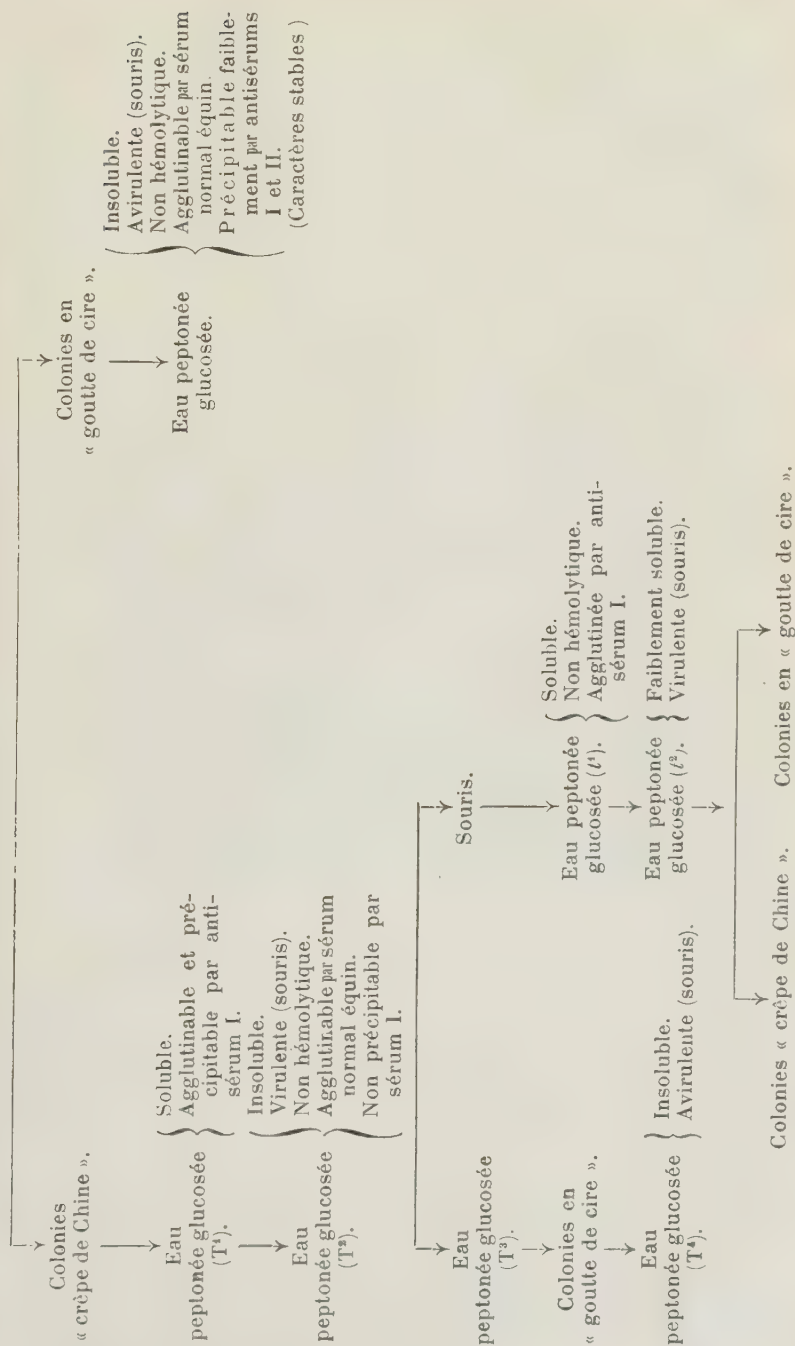
De ces colonies, les unes, en *goutte de cire* (2), ont un centre et des bords surélevés, régulièrement arrondis, séparés par une dépression circulaire et fournissent, après repiquage en milieu liquide, une culture avirulente, insoluble, hyperagglutinable, légèrement précipitable par les antisérums I et II, non hémolytique. Cette variété s'est montrée *stable* dans ses caractères, au cours des repiquages ultérieurs.

Les autres colonies, plus petites, ont un aspect misérable, tout à fait différent de celui des colonies de pneumocoques virulents, des contours irréguliers, une surface légèrement granuleuse, au reflet mat et terne de *crêpe de Chine*. En milieu liquide, elles fournissent des cultures solubles, exclusivement agglutinables et précipitables par l'antisérum I. Mais la culture-fille qui suit celle-ci offre des caractères tout différents : elle

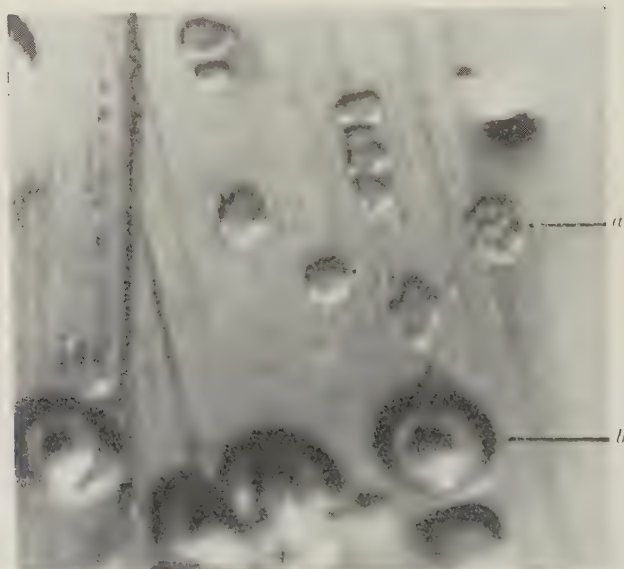
(1) *Loc. cit.*

(2) Cette dénomination s'applique uniquement à l'aspect des colonies de l'échantillon El. et nous ne prétendons lui attribuer aucune valeur de classification en général.

El.25 . insoluble, virulent (souris et lapin), précipitable faiblement par antisérums I et II.



est insoluble, hyperagglutinable, non hémolytique, non précipitable par l'antisérum, et virulente pour la souris (dose mortelle, sous la peau : 10^{-5} cent. cube); en un mot, elle a presque les mêmes caractères que la culture El. 25. Des tentatives de dissociation faites sur gélose-sang, à partir d'un troisième passage (T^3) en eau peptonée glucosée ne fournissent qu'un seul type de colonies, en *goutte de cire*, identiques aux colonies de la culture El. 25. Ces colonies donnent naissance en



Cliché Deffandre-Bretey.

FIG. 4. — *a*, colonies « crêpe de Chine » (virulentes);
b, colonies « goutte de cire » (avirulentes).

milieu liquide à une culture (T^4) soluble et avirulente. Cette fois-ci, pas de colonies du type « *crêpe de Chine* » : la culture a entièrement dégénéré dans le troisième passage en eau peptonée.

La culture T^2 encore virulente a été injectée à la souris. Au sortir de l'animal, première culture T^1 soluble et agglutinable par l'antisérum I, non hémolytique, deuxième culture (T^2) tardivement soluble et virulente (dose mortelle : 10^{-5} cent. cube). Pour vérifier encore l'hypothèse du dédoublement, un isole-

ment est fait sur gélose-sang ; il redonne à nouveau les deux types de colonies décrites.

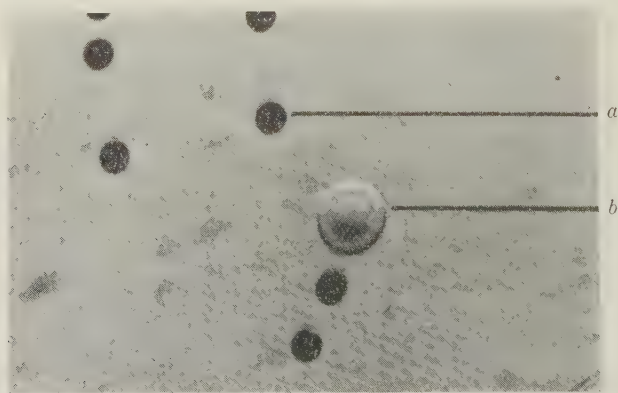
En résumé, il s'agit d'un germe qui montre, lors de passages en milieu liquide, deux types de colonies. Les unes paraissent définitivement dégénérées, les autres conservent, sauf un aspect anormal des colonies, les caractères des pneumocoques authentiques, mais, lors de nouveaux repiquages, présentent à deux reprises le même dédoublement. Finalement, la souche qui a toujours été cultivée *in vitro* dégénère en totalité lors d'un dernier passage ; la souche inoculée à la souris continue à se dédoubler. *Tout se passe comme si, à chaque génération et à partir d'une souche virulente* — que celle-ci provienne d'une colonie unique ou d'un passage par souris — *une partie des germes présentait une mutation définitive vers la forme dégénérée*. A noter que dans le cas observé par nous, les germes sont insolubles et avirulents ou solubles et aussi virulents que ceux de la culture origine El.25 (dose mortelle : 10^{-5} cent. cube). Nous n'avons pas trouvé de formes intermédiaires.

Voici maintenant un deuxième exemple de variation spontanée observé par nous. Le pneumocoque Lev. du type III est isolé d'un crachat pneumonique. Les colonies offrent l'aspect classique en larmes, la culture liquide est uniformément trouble, dissoute en quelques minutes par les sels biliaires et tue la souris, par voie 'sous-cutanée, à 10^{-6} cent. cube, le lapin à 10^{-2} cent. cube, le cobaye à 10^{-1} cent. cube ; elle est exclusivement agglutinée et précipitée par l'antisérum du type III. On repique cet échantillon conservé à la glacière, en gélatine, depuis son isolement, c'est-à-dire depuis seulement douze jours, pour préparer une provision d'antigène. Deux passages successifs sont faits en eau peptonée glucosée (2 p. 1.000) à douze heures d'intervalle, puis après un passage en macération d'estomac de porc glucosée (2 p. 1.000), on ensemence plusieurs litres de ce dernier milieu, à 35°. La croissance s'opère très vite ; mais, après dix-huit heures, au moment de centrifuger la culture, quelle n'est pas notre surprise d'apercevoir des *grumeaux* volumineux déposés au fond des ballons...

Nous étudions alors la culture et constatons, qu'auto-agglutinable, elle est devenue en même temps *insoluble* dans les sels

biliaires. Sur gélose Martin glucosée, ce ne sont plus les colonies en larmes bien connues, mais de petites colonies opaques, glissant sur gélose lors du prélèvement et s'effritant à toute tentative d'émulsion. Cette culture d'aspect insolite, une fois centrifugée, n'est plus précipitable par l'antisérum III et conservera ses caractères *stables* au cours de repiquages ultérieurs.

Pour ce pneumocoque III, comme pour le pneumocoque I précédent, nous avons eu la curiosité de suivre pas à pas les différents stades de la dégradation. Un tube de culture incorporée à



Cliché Desfandre-Brethey.

FIG. 2. — *a*, colonies opaques (avirulentes);
b, colonies transparentes (virulentes).

la gélatine a été extrait de la glacière, et ensemencé en eau peptonée glucosée (2 p. 1.000), puis des passages quotidiens ont été faits dans ce dernier milieu. *Les quatre premiers passages*, ensemencés sur gélose, ont fourni uniquement des colonies en larmes d'aspect classique. *Au cinquième passage*, la culture liquide, jusqu'ici uniformément trouble, présente un dépôt léger et se dissout mal dans les sels biliaires, mais ses caractères d'agglutination et de précipitation sont encore normaux. Repiquée sur gélose, elle fournit deux variétés de colonies très différentes : les unes, les plus nombreuses, déjà signalées, petites, opaques, très saillantes, d'aspect laiteux, glissant sur l'agar, d'autres, beaucoup plus rares, deux à trois fois plus grandes, plates, transparentes, portant une éminence à leur

centre. Dès *le septième passage*, la culture liquide arrive à posséder les mêmes caractères que la culture des gros ballons précédemment décrite : grumeleuse, agglutinée, insoluble, non précipitable par l'antisérum III et ne possédant plus qu'un type unique de colonies sur la gélose, les colonies opaques.

Chacun de ces échantillons de pneumocoque a montré à un certain stade de sa dégradation, comme on l'a remarqué, deux variétés de colonies, d'aspect et de pouvoir pathogène différents. On a noté encore que dans le cas du pneumocoque El., les germes solubles et virulents ne possédaient pas de colonies S, pas plus qu'aux germes avirulents et insolubles ne correspondaient des colonies du type « rough ». Nous avons fait la même remarque chez de nombreux échantillons de pneumocoque en voie *de dégradation spontanée* : en ce cas, les caractères des échantillons virulents tels que virulence, solubilité, pouvoir hémolytique, agglutinabilité et précipitabilité par l'antisérum, *disparaissent sans que les colonies deviennent rugueuses* : bien au contraire, elles prennent souvent un aspect luxuriant et gras.

Nous avons d'autre part observé des colonies S et R d'aspect tranché au cours de repiquages quotidiens de divers pneumocoques I et II dans du *bouillon additionné d'antisérum* homologue $\left(\frac{1}{10}\right)$. En ce cas, on voit apparaître sur gélose-sang ou gélose Martin glucosée (2 p. 1.000), dès les premiers passages, les colonies rugueuses mêlées aux colonies lisses, puis les rugueuses exclusivement. En même temps, les germes perdent à la fois virulence, solubilité, pouvoir hémolytique, agglutinabilité et précipitabilité par l'antisérum. Il existe donc, au cours de la dégradation du pneumocoque, d'autres aspects de colonies que l'aspect « rough ». Blake et Trask (1), cultivant le pneumocoque dans le bouillon additionné d'antisérum, ont signalé toute une série d'aspects intermédiaires entre les colonies S et R typiques. Certaines de ces formes sont stables, d'autres non. Des formes intermédiaires ont été également observées par d'autres auteurs (Yoshioka, Paul, Reimann, Dawson).

(1) *J. Bact.*, 25, 1933, p. 289.

Un récent travail très documenté de Dawson (1) pose à nouveau la question complexe des colonies pneumococciques. Ce sont trois types de colonies, et non pas deux seulement, qu'il faudrait compter chez le pneumocoque : un type muqueux, correspondant aux pneumocoques virulents, le type « smooth » classique qui, pour Dawson, représente à la vérité une variété « rough » de pneumocoque, enfin, le type « rough » proprement dit. Dawson figure des formes de transition allant des colonies du deuxième type à celles du troisième type et *vice versa*. Comme lui, nous avons observé des formes de passage intermédiaires entre les deuxième et troisième types, dans la culture de divers pneumocoques en bouillons additionnés d'antisérums homologues. Dawson pense que ces dénominations de colonies doivent être révisées chez le pneumocoque et unifiées pour les différentes espèces microbiennes. Nous croyons également que le terme *rough* a pris une acception mal définie. Appliqué d'abord à l'aspect irrégulier de certaines colonies, ce terme désigne maintenant, sous la plume de divers auteurs, l'état dégradé de certains pneumocoques, *sans que ces échantillons possèdent des colonies rugueuses*. On peut aussi se demander si le simple aspect d'une colonie permet toujours de préjuger infailliblement de ses propriétés. Il serait utile d'adjoindre à la description des colonies le signalement de leurs principales propriétés biologiques. Il faudrait tenir compte des facteurs multiples qui peuvent faire varier l'aspect des colonies : technique d'ensemencement, composition du milieu, différences inhérentes à l'échantillon microbien étudié, etc.

Il est possible d'ailleurs que les aspects divers des colonies correspondent à différents modes ou peut-être à différentes vitesses de variation du pneumocoque. En pratique, la conservation *in vitro* aboutit d'une façon presque inéluctable à des changements parfois très étendus des caractères. Mais les échantillons se comportent, à cet égard, de façon diverse. Depuis longtemps, Truche et l'un de nous (2) signalions des pneumocoques à virulence *stable*, d'autres à virulence *fragile*, pour le lapin. Les nombreux faits observés depuis lors ont confirmé notre opinion. Certains échantillons conservent leur activité

(1) *J. Path. Bact.*, 29, 1934, p. 323.

(2) Ces *Annales*, 26, 1912, p. 530.

pour la souris et le lapin pendant de longues années (cas El.), tandis que chez d'autres elle peut fléchir dès les premières semaines après l'isolement (cas Lév.). Farago (1) note avec raison que les phénomènes de dissociation s'observent chez les pneumocoques virulents.

La variation peut intéresser deux caractères, virulence et solubilité, ou encore virulence et agglutinabilité. Dans les passages en antisérum, nous avons vu souvent l'agglutinabilité disparaître avant la précipitabilité. Les variations peuvent intéresser simultanément toute une série de caractères. Elles se produisent brusquement, ou apparaissent insensiblement, s'étendant sur plusieurs années, avec des oscillations jusqu'à la chute irrémédiable. Une fois produite, la dégénérescence paraît définitive, les passages par les animaux réussissent seulement à retarder son apparition. La même observation a été faite par Reimann. Le degré de dégénérescence varie suivant les échantillons et les méthodes de dégradation. Nous n'avons jamais vu, chez les pneumocoques dégénéralent lentement au cours de plusieurs années, reparaitre, d'une façon durable, les propriétés primitives. Au contraire, chez un pneumocoque dont la culture répétée en bouillon-antisérum avait modifié les propriétés, nous avons vu reparaitre certaines d'entre elles, au cours de passages dans un antisérum hétérologue.

Quelle est l'origine de ces variations? Le changement soudain de milieu imposé aux pneumocoques pathogènes qui viennent d'être extraits de l'organisme joue sans doute un rôle important. Toutefois, cette dégénérescence ne se révèle parfois à nos yeux que plusieurs années seulement après la sortie des germes de l'organisme. Aussi ne peut-on affirmer que ce changement de milieu soit la cause unique des variations. Par ailleurs, si les pneumocoques gardés *in vitro* se modifient, les pneumocoques conservés *in vivo* par passages chez les animaux ne restent pas non plus immuables. Les échantillons très virulents demeurent virulents, comme Truche et l'un de nous (2) l'avons vu, au cours des passages par souris et lapin, mais les pneumocoques moins actifs peuvent cesser de faire des passages. Dans l'organisme humain, on a signalé des différences entre les pneumo-

(1) *Zentralbl. f. Bakt. Orig.*, 125, 1932, p. 341.

(2) *Ces Annales*, 27, 1913, p. 322.

coques isolés du sang d'un malade, à différentes périodes de la pneumonie [Viktorow, Semzowa et Sinjuschina (1)]. Nous avons parfois isolé des colonies différentes dans un même produit pathologique, et Cianci (2) rapporte une observation analogue. Un de nos échantillons de pneumocoque, isolé d'une méningite, offrait les caractères des germes en voie de variation, insolubilité dans les sels biliaries et absence de pouvoir hémolytique, avec une faible virulence pour la souris. Des auteurs considèrent que les espèces microbiennes — entre certaines limites propres à chacune d'elles — sont susceptibles de variations étendues; ces variations de la phase S à la phase R [Seppilli] (3) se développent dans les deux sens, indépendamment de la possibilité de mutations vraies.

Si l'origine de ces variations est obscure, leur *mécanisme* le demeure également. D'après Marchal (4), deux causes d'erreur principales sont à éviter dans ces recherches. La première est que « nous attribuons à une souche... le caractère moyen d'une population et non celui d'une unité ». C'est là une cause d'erreur inévitable dans les études bactériologiques. La seconde est la possibilité de cultures mixtes : l'emploi des *cultures nées d'un germe* peut seul éliminer cette objection. Parmi les variations, il est probable que les unes, peu accentuées, sont plus ou moins durables et *réversibles* : telles pourraient apparaître les variations de solubilité notées chez les pneumocoques conservés à la glacière dans la gélatine, telles sont les transformations de R en S observées par divers auteurs (Griffith, Neufeld et Levinthal, Dawson, Alloway, Baurhenn, etc.). Les autres variations sont *irréversibles*, véritables mutations, — s'il est permis d'employer ce mot pour des êtres à reproduction asexuée, — mutations au cours desquelles un pneumocoque primitivement virulent, typique, perd brusquement toutes les propriétés des germes virulents et présente une série de propriétés opposées (Reimann, nous-mêmes).

Quoi qu'on puisse penser de l'origine et du mécanisme de ces différentes variations, il s'agit là de faits d'observation journa-

(1) *Zentralbl. Bak., Orig.*, 1933, p. 35.

(2) *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 9, fasc. 9, 1934, p. 993.

(3) *Giorn. Batt. e Immunol.*, 12, 1934, p. 1.

(4) *Variation et mutation en bactériologie*. Paris (Le François, édit.), 1932.

lière dont on ne saurait diminuer l'importance. Leur existence qui n'est pas limitée à l'espèce pneumocoque appelle quelques remarques.

Pour ceux qui ont à *conserver une collection*, il y a lieu de surveiller chaque échantillon, en vérifiant de temps à autre l'existence des caractères propres à un type déterminé. Le pneumocoque se présente, au sortir de l'organisme infecté, doué de propriétés qu'il perd entre nos mains. Le problème consiste à retarder le plus possible la disparition de ces propriétés. Aux procédés de conservation *in vitro*, avec repiquages le plus rares possibles, on joindra les procédés de conservation *in vivo*, sans toutefois oublier leurs causes d'erreur et parfois leur insuffisance.

Pour la *préparation des antisérums* dans un but diagnostique ou thérapeutique, la conservation d'échantillons typiques est de toute importance. L'accord des auteurs est fait depuis longtemps sur la nécessité de recourir à certains pneumocoques d'élite. Les échantillons déchus, s'ils réussissent à vacciner les animaux, ne paraissent pas propres à l'obtention d'antisérums actifs. On n'utilisera donc, chez les chevaux producteurs de sérums, que des pneumocoques ayant satisfait à un examen rigoureux : solubilité, haute virulence pour le lapin, agglutinabilité et précipitabilité par un antisérum de type. Chaque fois qu'on devra préparer une provision d'antigène, ce sera une précaution prudente d'éprouver l'échantillon utilisé. Mieux encore vaudra-t-il, une fois en possession de ces échantillons, se constituer une importante provision d'antigène, avant qu'ils ne soient atteints par la dégénérescence. Conduite d'autant plus recommandable qu'il ne faut pas, dans la pratique, espérer qu'on « remontera » un pneumocoque dégradé.

D'un point de vue différent, la connaissance de ces variations du pneumocoque fait saisir la *difficulté du diagnostic de l'espèce*. Lorsqu'on examine le résultat d'un ensemencement de crachat sur gélose, on recherche naturellement les colonies qui présentent un aspect typique. Si l'on ne rencontre pas ce dernier, on élimine les colonies comme étrangères au pneumocoque. L'inoculation des produits pathologiques à l'animal élimine d'une façon aussi « cavalière » les germes non pathogènes pour l'espèce employée.

Mêmes causes d'erreur dans le *diagnostic différentiel*. Le

diagnostic des streptocoques avec les pneumocoques ne peut être posé avec certitude qu'autant que les pneumocoques offrent les caractères liés à la virulence. Quand font défaut avec le pouvoir pathogène pour les animaux, pouvoir hémolytique, solubilité dans les sels biliaires, agglutinabilité, sécrétion de l'une ou l'autre gomme qui caractérise certaines variétés, force nous est souvent de demeurer dans l'indétermination. Il est probable que maints échantillons microbiens rencontrés au niveau des muqueuses sont des pneumocoques dégradés, dont nous n'arrivons pas à démontrer la parenté avec des germes plus nobles.

Les mêmes remarques s'appliquent d'ailleurs à la *recherche du pneumocoque chez les sujets sains*. L'étude des échantillons déchus ou n'ayant pas encore accédé à la virulence est fort difficile à l'heure actuelle, faute de moyens sûrs d'identification. Il est possible que leur connaissance soit aussi et plus importante pour l'hygiéniste que celle des échantillons franchement pathogènes. Ces remarques indiquent la nécessité de les mieux connaître.

RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES DES VENINS ET LES ANTICORPS DES SÉRUMS ANTIVENIMEUX

(PREMIER MÉMOIRE)

VENIN DE *VIPERA ASPIS* ET SÉRUMS ANTIVIPÉRINS *V. aspis*.

par E. CÉSARI et PAUL BOQUET.

Les venins des différentes espèces de serpents contiennent plusieurs sortes de toxines (neurotoxine, surtout abondante dans les venins des Colubridés; hémorragine, prédominant dans les venins des Vipéridés...) et diverses diastases (ferments coagulant et anticoagulant, ferment protéolytique, proferment hémolytique...) jouissant, comme toutes les toxines et beaucoup de diastases, de propriétés antigéniques. Les sérums antivenimeux doivent posséder, en conséquence, les anticorps qui répondent à ces multiples antigènes. De fait, les bons sérums antivenimeux neutralisent non seulement les effets toxiques des venins qui ont servi à leur préparation, mais ils manifestent en outre des propriétés antagonistes vis-à-vis des activités diastasiques de ces mêmes venins.

Il va de soi que l'estimation des vertus thérapeutiques d'un sérum antivenimeux ne peut être rationnellement basée que sur l'évaluation de son aptitude à empêcher l'évolution des désordres pathologiques qui caractérisent l'envenimation occasionnée par le venin correspondant. On est donc obligé de considérer que seules les méthodes de titrage *sur le rif*, l'animal d'expérience étant pris comme instrument de mesure, peuvent donner la valeur de la puissance antivenimeuse d'un sérum.

Cependant les diastases des venins, le ferment coagulant par exemple, sont susceptibles de déterminer dans l'organisme des troubles dont l'importance, en certains cas, paraît être capitale. On peut donc présumer que les actions empêchantes exercées par les sérums antivenimeux vis-à-vis des phénomènes diasta-

siques engendrés par les venins, constituent des facteurs de l'activité thérapeutique de ces sérums et que la mesure de ces effets antagonistes réalisée *in vitro*, fournira des indications en rapport avec leur puissance antivenimeuse générale.

Quand bien même les ferments des venins ne joueraient aucun rôle actif dans les accidents de l'envenimation, il serait encore permis de supposer que chez les animaux traités en vue de la production des sérums antivenimeux, les anticorps engendrés par les diastases se développent parallèlement à la formation des antitoxines et que le dosage des antiferments est susceptible de donner éventuellement une mesure indirecte de la force antitoxique réelle des sérums antivenimeux.

De nombreux auteurs, Calmette et Massol, Stephens et Myers, Noc, Houssaye et Negrete, Vellard et Brazil, ont fait des recherches fort intéressantes dans cette voie, mais de l'ensemble de leurs travaux ne se dégage aucune conclusion définitive quant à la question de savoir s'il est possible ou non d'évaluer, par l'incidence de leurs propriétés anticoagulantes et antihémolytiques, le pouvoir antitoxique des sérums antivenimeux.

C'est pour avoir une opinion sur cette question que nous avons entrepris les recherches dont nous commençons l'exposé dans ce premier mémoire consacré à l'étude du venin de la Vipère commune (*Vipera aspis*) et du sérum antivipérin correspondant. Nous nous sommes proposé, par la même occasion, de voir s'il était possible de tirer parti, en vue de la détermination du pouvoir antitoxique du sérum antivenimeux, des indications fournies par la réaction de précipitation, préconisée par M. Nicolle, Césari et Debains, ou par la réaction de *floculation* découverte par G. Ramon et universellement appliquée aujourd'hui pour la titration *in vitro* des sérums antidiphthérique et antitétanique.

Ce programme de recherches devait nécessairement comporter, comme préambule, le titrage de la toxicité du venin de vipère sur les petits animaux de laboratoire, la mesure du pouvoir coagulant et anticoagulant de ce venin, et le dosage de son proferment hémolytique.

1° LES ANTIGÈNES DU VENIN DE *VIPERA ASPIS*

Le venin utilisé pour les titrages de la toxicité et des activités diastasiques représente le mélange des sécrétions recueillies sous les crochets, par pression des glandes à venin, sur environ 600 vipères capturées en diverses régions de la France. Sitôt récolté sur les reptiles vivants, le venin a été desséché sous la cloche à vide; les paillettes mélangées et finement broyées ont fourni une poudre qui, conservée à l'abri de la lumière, a constitué notre échantillon étalon.

Pour les besoins de l'expérimentation, le venin sec prélevé dans cette provision était dissous dans l'eau physiologique de façon à obtenir une solution mère titrée au centième, utilisée telle quelle ou après chauffage au bain-marie en tube scellé, le jour même ou, au plus tard, le lendemain de sa préparation.

Mesure de la toxicité *in vivo*.

L'étude expérimentale de l'envenimation par le venin de *Vipera aspis* a fait l'objet de nombreux travaux (Kaufman, 1891; C. Phisalix et G. Bertrand, 1894-1897; C. Phisalix, 1894-1903; Arthus, ...).

Les expériences effectuées pour déterminer le degré de toxicité de notre échantillon standard de venin de vipère ont été poursuivies sur le lapin, le cobaye et la souris. On a cherché à fixer les doses qui se montrent mortelles dans les cas où le venin est introduit directement dans le torrent circulatoire et dans les cas où il est injecté dans le tissu conjonctif sous-cutané.

D'autre part, nous avons essayé de dissocier les effets de l'envenimation en administrant aux animaux, dans les mêmes conditions, le venin chauffé à 60° ou à 70° pendant une demi-heure.

EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN.

Administration du venin par la voie sanguine. — Introduit directement dans la veine, notre échantillon de venin tue le lapin à la dose de 0 milligr. 35 par kilogramme de poids vif. A cette dose, à peine a-t-on retiré l'aiguille du vaisseau que les lapins ont des mouvements propulsifs saccadés, poussent des cris aigus, sautent d'une pièce, tombent sur le flanc, sont agités

de quelques convulsions et meurent. Le drame se déroule en deux à trois minutes. A l'autopsie, on trouve le cœur arrêté en systole, les poumons exsangues, le foie congestionné; le cœur, la veine porte, la veine cave sont gorgés de caillots sanguins.

Des doses moindres de venin (0 milligr. 30 par kilogramme) ne déterminent que des accidents transitoires : respiration très accélérée, congestion intense du réseau veineux de l'oreille, phénomènes qui s'apaisent au bout d'une heure.

Le venin chauffé à 60° se comporte comme le venin frais. A 70° l'activité du poison est notablement affaiblie; il faut injecter une dose sept fois plus forte (2 milligr. 5 par kilogramme) pour que le lapin succombe, la mort survenant alors, comme précédemment, en quelques minutes.

Administration du venin par la voie sous-cutanée. — Injecté sous la peau, le venin de vipère tue le lapin, à la dose de 8 milligrammes par kilogramme de poids vif, en deux à trois heures. La mort ne survient jamais dans un délai plus court, quand bien même on aurait employé des quantités plus considérables de venin (12 milligrammes par kilogramme). Avec 6 milligrammes par kilogramme, le lapin succombe en dix à quinze heures; au-dessous de cette dose, les animaux résistent.

Localement, l'injection du venin provoque la formation d'un œdème mou, hémorragique. A l'autopsie, on note une violente congestion de l'intestin et du péritoine avec d'abondantes pétéchies; le foie et la rate sont fortement hyperémiés. On trouve des caillots dans le cœur.

Le chauffage atténue la toxicité. Il faut administrer 15 milligrammes par kilogramme pour tuer le lapin, par la voie sous-cutanée, avec le venin chauffé à 60°. Les animaux supportent jusqu'à 60 milligrammes de venin chauffé à 70° par kilogramme. Les altérations relevées à l'autopsie sont les mêmes que celles occasionnées par le venin frais.

EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE.

Administration du venin par la voie sanguine. — L'injection de 0 milligr. 5 de venin de vipère dans la veine jugulaire fait périr le cobaye (420 à 450 grammes) en deux à trois minutes. Avec 0 milligr. 2, la mort survient en moins d'une heure;

avec 0 milligr. 1, l'animal ne succombe qu'au bout de plusieurs heures.

Lorsque la mort n'est pas immédiate, les cobayes présentent d'abord des troubles de l'équilibre, ils titubent, tombent, se relèvent, puis s'affaissent définitivement, poussent quelques cris et finissent dans le coma. Que la mort ait été rapide ou tardive, on voit les battements du cœur persister pendant quelques instants après l'ouverture du cadavre; on ne trouve de caillot ni dans le cœur, ni dans les vaisseaux; le sang est liquide et reste incoagulable. L'intestin est le siège d'une congestion intense avec foyers hémorragiques multiples, la séreuse péritonéale et l'épiploon sont injectés, le foie et la rate sont normaux.

Le chauffage à 60° affaiblit notablement la toxicité du venin de vipère pour le cobaye. Il faut injecter au moins 5 milligrammes de venin chauffé à cette température pour provoquer la mort en moins de cinq minutes. Avec 1 milligramme, l'animal meurt en une douzaine d'heures ou survit.

Le venin chauffé à 70° possède la même nocivité que le venin chauffé à 60°.

Administration du venin par la voie sous-cutanée. — Il faut injecter plus de 1 milligr. 5 de venin sous la peau du cobaye pour que la mort s'ensuive; elle ne survient alors qu'au bout de vingt-quatre heures environ.

Il se produit localement un volumineux œdème mou, sanguinolent et une escarre humide, du diamètre d'une pièce de 2 francs, se forme au niveau de la peau. A l'autopsie, les cadavres montrent des lésions congestives et hémorragiques de l'intestin et du péritoine.

Des doses de venin comprises entre 1 milligr. 5 et 1 milligramme ne déterminent qu'une tuméfaction œdémateuse avec mortification du tégument cutané sur la surface d'une pièce de 0 fr. 50 à 1 franc. Si les sujets meurent, ce n'est que tardivement, après trente-six ou quarante-huit heures; ils ne succombent plus alors aux effets directs de l'envenimation mais à une infection microbienne ayant son origine dans la plaie cutanée ou à un envahissement par un « microbe de sortie ».

Le venin chauffé à 60° ne provoque la mort du cobaye qu'aux doses supérieures à 6 milligrammes. Les animaux meurent en

une dizaine d'heures ; les lésions sont identiques à celles que détermine le venin non chauffé.

A 70°, la toxicité est affaiblie davantage ; il faut employer 10 milligrammes de venin pour tuer le cobaye.

EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS.

Administration du venin par la voie sanguine. — Il suffit d'injecter 0 milligr. 1 de venin de vipère dans une veine de la queue pour tuer la souris (18 à 20 grammes) en moins de vingt minutes. Avec 0 milligr. 05, la mort arrive habituellement après une heure environ, mais quelques souris résistent à cette dose.

Les souris qui ont reçu la dose mortelle se mettent en boule, restent immobiles, la respiration accélérée, puis, après une courte période d'agitation, tombent sur le côté et meurent. A l'autopsie, on voit le cœur continuer à battre pendant quelques instants, l'intestin est congestionné. Le sang est incoagulable.

Administration du venin par la voie sous-cutanée. — La dose de 1 milligramme, injectée sous la peau, tue la souris en une demi-heure environ ; la dose de 0 milligr. 1 en quelques heures.

Que l'injection soit faite dans la veine ou sous la peau, le venin de vipère, chauffé à 60° ou à 70°, se montre aussi actif pour la souris que le venin non chauffé.

REMARQUES GÉNÉRALES. — Il ressort de ces données expérimentales que la sensibilité des petits animaux de laboratoire à l'égard des poisons du venin de *Vipera aspis* offre, d'une espèce à l'autre, des différences d'ordre quantitatif et qualitatif.

Rapportées au kilogramme d'animal, les doses de venin capables de provoquer en moins de vingt minutes la mort des sujets éprouvés par la voie veineuse sont respectivement de 0 milligr. 35 pour le lapin, 1 milligr. 14 pour le cobaye, 5 milligrammes pour la souris. Les doses mortelles, lorsque le venin est administré sous la peau, sont, par kilogramme d'animal, d'environ 6 milligrammes pour le lapin, 4 milligrammes pour le cobaye, 5 milligrammes pour la souris.

Il est à noter que l'introduction du venin de vipère dans la circulation sanguine, qui détermine presque instantanément chez le lapin la coagulation massive du sang avec arrêt du cœur (1), ne provoque jamais ces phénomènes chez le cobaye et la souris. Il est à remarquer aussi que les accidents de l'envenimation aiguë (mort en quelques heures) ou subaiguë (mort en un jour), consécutifs à la pénétration du venin dans le torrent circulatoire, ne se manifestent en aucun cas chez le lapin, alors qu'on les observe couramment chez le cobaye et la souris.

Rapprochées des constatations relevées chez ces animaux lorsque le venin a pénétré dans l'organisme par la voie sous-cutanée, les observations qui précèdent prouvent que le lapin se montre infiniment plus sensible que le cobaye et la souris à l'action coagulante du venin de vipère, tandis que ces derniers animaux sont relativement plus sensibles que lui au poison hémorragipare du venin.

Les différences de sensibilité que ces animaux montrent ainsi vis-à-vis des divers principes nocifs contenus dans le venin de vipère doivent être retenues pour expliquer les divergences qu'accusent les effets du chauffage à 60° ou à 70° selon l'espèce animale sollicitée pour témoigner des modifications apportées par la chaleur à la toxicité du venin.

Il apparaît toutefois que ces divergences sont d'ordre purement quantitatif et ne tiennent nullement à ce que la chaleur — au moins pour les températures de 60° et de 70° — aurait affaibli ou détruit tel ou tel des éléments auxquels le venin doit son action pathogène. On remarquera, en effet, que si le venin, chauffé à 60° ou à 70°, semble plus ou moins atténué selon l'espèce animale sur laquelle il opère, la symptomatologie et la nature des lésions produites chez chacune d'elles en particulier, ainsi que le mécanisme de la mort, sont les mêmes, qu'il s'agisse de venin frais ou de venin chauffé, aussi bien dans le cas où l'administration du venin a été faite par la voie veineuse que dans le cas où elle a été faite par la voie sous-cutanée.

(1) Signalons incidemment que l'injection de venin de vipère dans la veine du lapin, à dose massive (75 milligrammes par kilogramme effectuée dans le but de substituer l'effet anticoagulant à l'effet coagulant du venin, n'a pas permis d'éviter la mort instantanée résultant de la formation de caillots dans le cœur.

Peut-être y aura-t-il lieu de tenir compte de ces considérations lorsqu'il s'agira d'apprécier, au moyen des réactifs vivants, la valeur thérapeutique des sérums antivenimeux.

Mesure du pouvoir coagulant *in vitro*.

L'étude des propriétés coagulantes et anticoagulantes des venins des diverses espèces de serpents a fait l'objet de nombreux travaux (Stephens et Myers, 1898 ; Noc, 1898 ; puis Calmette et Noc, C.-J. Martin, 1905 ; Arthus, 1910 ; Massol, 1914 ; Houssaye et Sordelli, 1918 ; Vital Brazil et J. Vellard, 1928).

On admet aujourd'hui que le pouvoir coagulant des venins est dû à l'action d'une pseudo-thrombine spécifique, tandis que leur pouvoir anticoagulant est, suivant les venins, tantôt le fait d'un ferment lipoïdolytique, agissant sur la cytozyme, tantôt le fait d'un ferment protéolytique agissant sur la sérozyme, les deux mécanismes ayant pour effet d'empêcher la formation de la thrombine spéciale du sang — et aussi le fait du ferment protéolytique détruisant le fibrinogène ou digérant la fibrine à l'état naissant.

Le venin de *Vipera aspis* est à la fois coagulant et anticoagulant. Ces deux actions se manifestent simultanément lorsqu'on fait agir des solutions de venin sur le plasma du sang, le résultat objectif constaté *in vitro* marquant la somme algébrique des effets exercés par les deux facteurs contraires qui agissent en même temps sur le fibrinogène.

Nous avons déterminé les limites des actions anticoagulante et coagulante du venin de la Vipère commune, en utilisant la technique suivante qui se trouve être, à peu de chose près, la même que celle déjà employée avant nous par J. Vellard.

TECHNIQUE. — *Réactifs*. — Plasma frais, obtenu par centrifugation prolongée de sang de cheval citraté à 1 p. 100 (95 parties de sang pour 5 parties d'une solution de citrate de soude à 20 p. 100).

Sérum normal frais de cheval citraté à 1 p. 100. (Le sérum normal n'a été introduit dans la réaction qu'aux fins de substitution d'un sérum antivenimeux spécifique lorsqu'on veut déterminer le pouvoir antagoniste de ce dernier).

Solution de chlorure de calcium au 1/100.

Quatre solutions en eau physiologique de venin de *Vipera aspis* titrées au 1/100 (solution mère), au 1/1.000, au 1/10.000 et au 1/100.000.

Procédé. — On détermine dans une première expérience, portant sur une série de tubes contenant chacun 2 cent. cubes de plasma citraté, additionnés de 0 c. c. 5 de sérum normal citraté et de 0 c. c. 25 d'eau physiologique, le nombre de gouttes de la solution de CaCl_2 nécessaire pour assurer la coagulation complète du plasma après deux heures de séjour à l'étuve à 37°.

Dans une batterie de tubes à hémolyse stérilisés, on verse alors dans l'ordre suivant :

1° Dans tous les tubes : 0 c. c. 5 de sérum de cheval frais, citraté à 1 p. 100 ;

2° Dans chacun des tubes, à l'aide d'une pipette compte-gouttes débitant XX gouttes au centimètre cube, des doses croissantes de venin d'après le barème suivant :

I goutte, II gouttes, V gouttes des dilutions de venin à 1/100.000, 1/10.000, 1/1.000, 1/100 (solution-mère), de manière à avoir dans la série des tubes des quantités de venin dosées suivant la progression : 0 milligr. 0005, 0 milligr. 001, 0 milligr. 0025, 0 milligr. 005, 0 milligr. 01, 0 milligr. 025, 0 milligr. 05, 0 milligr. 1, 0 milligr. 25, 0 milligr. 5, 1 milligramme et 2 milligr. 5 de venin sec. On égalise le volume à V gouttes en versant dans les tubes où cela est nécessaire : IV ou III gouttes d'eau physiologique.

3° Dans tous les tubes, 2 cent. cubes de plasma citraté.

4° Le nombre de gouttes de la solution de CaCl_2 au 1/100 déterminé par l'essai préalable.

Un tube témoin contenant 0 c. c. 5 de sérum normal et 2 cent. cubes de plasma citraté recalcifié est additionné de V gouttes d'eau physiologique.

Les tubes fermés avec des bouchons de caoutchouc stériles sont retournés pour opérer le mélange des réactifs et portés à l'étuve à 37°.

On fait des lectures après une demi-heure et une heure de séjour à l'étuve. Les tubes sont alors retirés de l'étuve et une dernière lecture est effectuée après une heure de séjour à la température du laboratoire.

Le tableau suivant donne le schéma des réactions obtenues avec le venin frais et le venin chauffé à différentes températures.

Dans les conditions de l'expérience, 0 milligr. 001 suffit pour provoquer en un quart d'heure la coagulation de 2 cent. cubes de plasma de cheval. A partir de 0 milligr. 5, la coagulation est empêchée.

Dans les tubes où le processus de coagulation a été entravé par le venin, l'addition ultérieure de thrombine du sang est impuissante à provoquer la formation d'un caillot, ce qui tend à montrer que l'action anticoagulante du venin de *Vipera aspis* est imputable au ferment protéolytique qui a consommé la substance fibrinogène du plasma ou digéré la fibrine au fur et à mesure de sa formation.

Nous avons employé, autant que possible, dans nos essais, le plasma du même cheval, mais nous avons pu nous rendre

TABLEAU I.

NUMÉRO des tubes	DOSES de venin en milligr.	VENIN non chauffé			VENIN chauffé à 60°			VENIN chauffé à 70°			VENIN chauffé à 80°		
		1/2 h.	1 h.	2 h.	1/2 h.	1 h.	2 h.	1/2 h.	1 h.	2 h.	1/2 h.	1 h.	2 h.
4	0,0005	0	0	C	0	0	C	0	0	0	0	0	c
2	0,001	C	C	C	0	0	C	0	c	c	0	0	c
3	0,0025	C	C	C	C	C	C	0	0	0	0	0	c
4	0,005	C	C	C	C	C	C	0	0	0	0	0	C
5	0,01	C	C	C	C	C	C	0	0	0	0	c	C
6	0,025	C	C	C	C	C	C	0	0	0	0	0	C
7	0,05	C	C	C	c	C	C	0	0	0	0	0	c
8	0,1	C	C	C	c	C	C	0	0	0	0	0	c
9	0,25	c	c	c	c	c	C	0	0	0	0	0	0
10	0,5	0	0	0	c	c	c	0	0	0	0	0	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins .	0	0	0	c	0	0	c	0	0	c	0	0	c

C, coagulation massive; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

compte, en utilisant les plasmas de trois chevaux différents, que les pouvoirs coagulant et anticoagulant du venin de vipère s'exerçaient à leur égard sensiblement de la même façon.

Les plasmas d'autres espèces animales se sont révélés plus sensibles à l'action coagulante du venin de vipère que le plasma de cheval, les plus coagulables étant ceux de chèvre et de mouton, puis celui de l'âne, et enfin celui du bœuf.

ACTION DU CHAUFFAGE. — Les pouvoirs coagulant et anticoagulant du venin de vipère sont inégalement influencés par l'action de la chaleur. Ni l'un ni l'autre ne paraissent notablement affaiblis par le chauffage à 60°. Par contre, le chauffage à 70° faisant perdre une partie de son activité à la pseudo-thrombine sans amoindrir sensiblement la puissance du ferment anticoagulant, la prédominance d'action passe à ce dernier, lorsque le venin a été chauffé à cette température. Mais le pouvoir anticoagulant étant affecté à son tour à 80°, on voit réapparaître, dans le venin porté à cette température, pour certaines concentrations, l'effet coagulant qui avait paru éteint par le chauffage à 70°.

Ce fait, d'apparence paradoxale, avait été signalé déjà par Houssaye et Sordelli, à propos d'autres venins.

Mesure de l'action hémolytique.

Flexner et Noguchi ont établi, en 1902, que l'hémolyse provoquée *in vitro*, par certains venins, ne se produit régulièrement que lorsque les globules rouges soumis à leur action sont accompagnés d'une trace de sérum sanguin.

Plus tard, Calmette montra que le sérum nécessaire à l'hémolyse n'intervenait pas par son alexine et Kyes découvrit que le rôle activant appartenait à la lécithine du sérum. Le mécanisme complexe de l'action hémolytique des venins, fut complètement élucidé à la suite des remarquables travaux de Delezenne, M^{lle} Ledebt et Fourneau, démontrant que les venins possèdent un proferment qui, activé par le calcium, fournit une lipoïdase capable de disloquer les phosphatides du sérum en donnant naissance, par élimination de l'acide oléique, à un composé chimiquement défini, la lysocithine, doué d'une grande puissance hémolysante.

Les globules rouges des différentes espèces animales sont inégalement sensibles à ce principe hémolysant. Phisalix a vu, en 1902, que vis-à-vis du venin de la Vipère aspic, les hématies de lapin étaient plus résistantes que celles du chien. Houssaye et Negrete (1922), étudiant comparativement l'action hémolytique de différents venins, indiquent qu'il faut 0 milligr. 150 de venin de *Vipera aspis*, en présence de 0 c. c. 4 de sérum de chien, pour hémolyser en deux heures, à 37°, 1 cent. cube de globules rouges de chien à 5 p. 100.

Des raisons de commodité nous ont fait choisir, pour la détermination du pouvoir hémolytique des venins, les globules rouges de cheval et le sérum de cheval.

Les expériences effectuées dans le but de déterminer les conditions expérimentales les plus propices à la manifestation du phénomène, nous ont montré que la formation de la lysocithine dans le mélange venin + sérum, s'opérait beaucoup mieux à la température de l'étuve qu'à 0°, mais que, par contre, la lysocithine qui avait pris naissance dans le mélange, exerçait une action hémolytique beaucoup plus intense à 0° qu'à la température de 37°.

C'est à la suite de ces constatations que nous avons adopté, pour la mesure du pouvoir hémolytique des venins, la technique suivante :

TECHNIQUE. — Réactifs. — Sérum de cheval normal chauffé à 56° pendant une demi-heure. Il est essentiel de toujours utiliser le sérum du même cheval.

Quatre solutions de venin de vipère titrées respectivement au 1/1.000, au 1/10.000, au 1/100.000, au 1/1.000.000.

Suspension au vingtième de globules rouges de cheval préalablement lavés et ramenés au volume du sang.

Procédé. — Dans une série de douze tubes à hémolyse stérilisés, on verse :

1° Dans tous les tubes, 0 c. c. 5 de sérum normal chauffé ;

2° Dans chacun des tubes, avec la pipette compte-gouttes, successivement III gouttes, VII gouttes, X gouttes de chacune des solutions de venin titrées au 1/1.000, au 1/10.000, au 1/100.000 et au 1/1.000.000, de manière à avoir dans la série des tubes des quantités de venin dosées suivant la progression 0,00015, 0,00035, 0,0005, 0,0015, 0,0035, 0,005, 0,015, 0,035, 0,05, 0,15, 0,35, 0,5 (exprimées en milligrammes). On complète le volume à X gouttes avec de l'eau physiologique.

On place les tubes à l'étuve à 37° pendant une heure pour permettre au venin d'attaquer les lipoides du sérum et de produire la lysocithine.

Au sortir de l'étuve, on plonge les tubes dans un bain de glace fondante, et on ajoute, dans chaque tube, 1 cent. cube de la suspension de globules rouges préalablement refroidie.

La lecture de la réaction se fait au bout d'une demi-heure.

Le tableau suivant (tableau II) indique les résultats obtenus.

TABLEAU II.

NUMÉRO des tubes	DOSES de venin en milligramme	CONTACT DU VENIN ET DU SÉRUM avant l'addition des globules rouges pendant une heure à la température de			
		0° Hémolyse à 0°	0° Hémolyse à 37°	37° Hémolyse à 0°	37° Hémolyse à 37°
1	0,5	H	H	H	h
2	0,35	H	H	H	h
3	0,15	H	H	H	h
4	0,05	H	H	H	h
5	0,035	0	h	H	h
6	0,015	0	0	H	h
7	0,005	0	0	H	h
8	0,0035	0	0	H	h
9	0,0015	0	0	H	h
10	0,0005	0	0	H	0
11	0,00035	0	0	h	0
12	0,00015	0	0	0	0
Témoins	0	0	0	0	0

H, hémolyse complète; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.

Dans ces conditions, on constate que 0 milligr. 0005 de venin engendre une quantité suffisante de lysocithine pour hémolyser, à 0°, 1 cent. cube de globules rouges de cheval à 5 p. 100.

INFLUENCE DU CHAUFFAGE.

Le chauffage du venin à 60° n'atténue pas l'activité de la lipoidase. Chauffé à 70°, le venin se montre moins actif.

INFLUENCE DE LA NATURE DES GLOBULES ROUGES.

En utilisant comparativement des globules rouges de cheval, de bœuf et de mouton préparés dans les mêmes conditions, nous avons constaté que les premiers étaient les plus sensibles et les derniers les plus résistants.

2° LES ANTICORPS DU SÉRUM ANTIVIPÉRIN (V. *ASPIS*)

Les sérums antivenimeux éprouvés au cours de nos recherches provenaient de 7 chevaux, hyperimmunisés ou en cours d'immunisation, ayant uniquement reçu, pendant toute la durée du traitement auquel ils furent soumis, du venin de *Vipera aspis* chauffé une demi-heure à 58° et administré sous la peau.

Depuis le début de leur immunisation jusqu'à la date de la saignée qui a fourni les sérums étudiés, ces animaux avaient reçu, en tout :

- Le cheval 862 : 1 gr. 503 de venin ;
- Les chevaux 866 et 870 : 2 gr. 109 ;
- Le cheval 875 : 2 gr. 995 ;
- Le cheval 861 : 3 gr. 136 ;
- Le cheval 874 : 3 gr. 139 ;
- Le cheval 876 : 2 gr. 880 sous forme d'anavenin et 2 gr. 278 de venin.

Détermination du pouvoir antitoxique.

Pour établir et mesurer le pouvoir antitoxique des sérums antivenimeux, on a eu recours à la méthode des mélanges de

sérum et de venin, l'épreuve de neutralisation étant effectuée sur le lapin ou la souris blanche par voie veineuse, sur le cobaye et la souris par voie sous-cutanée.

EXPÉRIENCES SUR LE LAPIN. — *Voie veineuse.*

TECHNIQUE. — On ajoute à une solution de venin de *V. aspis* fraîchement préparée représentant environ dix doses mortelles (3 milligr. 2 par kilogramme de poids vif) des volumes variables du sérum antivenimeux, dont il s'agit de fixer la valeur, soit 0 c. c. 2, 0 c. c. 4, 0 c. c. 6, 0 c. c. 8, 1 cent. cube, 1 c. c. 5 par milligramme de venin. Après agitation, on laisse le mélange une demi-heure à l'étuve à 37° et, au bout de ce temps, on l'injecte lentement dans la veine marginale de l'oreille du lapin dont le poids a réglé la quantité de venin utilisée.

On a établi, par ce moyen, pour chacun des sérums antivenimeux, la dose de sérum nécessaire et suffisante pour neutraliser, vis-à-vis du lapin, 1 milligramme de venin de Vipère aspic.

Les chiffres ci-après donnent les éléments de ce titrage.

TABEAU III.

SÉRUM du cheval	POIDS des lapins éprouvés en grammes	QUANTITÉ de venin en milligr.	QUANTITÉ de sérum en cent. cubes	DOSE de sérum par milligramme de venin en cent. cube	
862. . . .	2.530	8,4	4,6	0,2	Mort en 55 minutes.
	2.150	6,85	2,05	0,3	Survit.
866. . . .	2.400	7,7	4,6	0,6	Mort en 10 heures.
	2.450	7,8	6,3	0,8	Survit.
870. . . .	2.500	8	8	1	Mort en 15 minutes.
	2.280	7,2	10,80	4,5	Survit.
875. . . .	2.320	7,4	5,9	0,8	Mort en 10 heures.
	2.100	6,7	6,7	1	Survit.
861. . . .	2.450	7,85	4,75	0,6	Mort en 10 heures.
	2.000	6,4	5,1	0,8	Survit.
874. . . .	2.500	8	4,6	0,2	Mort en 2 h. 55.
	2.200	7,2	2,4	0,3	Survit.
876. . . .	2.200	7	2,4	0,3	Mort en 2 h. 50.
	2.200	7	2,8	0,4	Survit.

Nous avons signalé ci-dessus, en rapportant les résultats des expériences effectuées pour déterminer la toxicité du venin de vipère par la voie sanguine, chez le lapin, que les doses léthales (0 milligr. 35 et au-dessus par kilogramme d'animal) déterminaient constamment la mort, par coagulation massive du

sang, en deux ou trois minutes, avant que les lésions hémorragiques caractérisant l'action des venins de vipéridés aient eu le temps d'évoluer. On voit, à la lecture du tableau — et de nombreux exemples observés par nous au cours des expériences qui furent nécessaires pour rechercher, par tâtonnements, la dose neutralisante de chaque sérum, et non rapportés ici, ont appuyé cette constatation — que les mélanges de venin (dix doses minima mortelles) et de sérum antivipérin contenant un excès de venin non neutralisé déterminent presque toujours les désordres de l'envenimation subaiguë ou lente, amenant la mort en une ou plusieurs heures (jusqu'à dix à quinze heures) avec production de lésions congestives et pétéchiales allant parfois jusqu'à l'hémorragie, le sang restant incoagulable.

Il apparaît donc que, dans les conditions où le titrage a été effectué, c'est-à-dire en injectant dans la veine des lapins un mélange contenant dix fois la dose minima mortelle de venin, la survie des animaux éprouvés indique non pas seulement la neutralisation du poison coagulant, mais aussi la neutralisation de l'hémorragine et, éventuellement, de la neurotoxine. Par conséquent, cette méthode permet d'évaluer aussi exactement que possible le pouvoir antitoxique global des sérums antivipérins.

Pour traduire en valeurs numériques les mesures obtenues dans les expériences ci-dessus, adoptons arbitrairement comme *unité venimeuse* (lapin-veine), la dose minima mortelle du venin de vipère qui nous a servi d'étalon rapportée au gramme d'animal (0 milligr. 00035) et, comme *unité antivenimeuse*, la quantité de sérum capable de neutraliser par mélange, au bout d'une demi-heure de contact, une unité venimeuse. Le pouvoir antivenimeux sera ainsi exprimé par le nombre d'unités antivenimeuses contenues dans 1 cent. cube de sérum.

Sur cette base conventionnelle, les titres des sérums antivipérins seraient, en chiffres arrondis, les suivants :

N^{os} 862 et 874 = 9.500 unités antivenimeuses ;

N^o 876 = 7.000 — n^{os} 861 et 866 = 3.500 ;

N^o 875 = 2.800 et n^o 870 = 1.900.

EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE.

Nous avons en vue, en nous adressant au cobaye comme instrument de titrage, d'apprécier la valeur des sérums anti-venimeux d'après leur aptitude à neutraliser le poison escarifiant du venin de vipère, c'est pourquoi nous avons adopté ici l'épreuve sous-cutanée.

TECHNIQUE. — On ajoute des quantités variables de sérum (0 c. c. 25, 0 c. c. 50, 0 c. c. 75, 1 cent. cube) à la dose de venin de vipère (1 milligr.) susceptible de provoquer la formation d'une escarre humide. Après contact d'une demi-heure, on injecte le mélange sous la peau du cobaye (animaux de 400 grammes environ). On examine les lésions au bout de vingt-quatre heures.

La réaction se juge sur la gamme qu'offrent les lésions qui se développent au niveau du point d'inoculation : escarre humide de dimensions de plus en plus réduites, tache violette, absence d'altération de la peau, marquant la neutralisation du poison nécrosant. (Tableau IV.)

TABLEAU IV

SÉRUM	1 MILLIGRAMME DE VENIN DE <i>V. Aspis</i> EST MÉLANGÉ A				
	1 cent cube	0 c. c. 75	0 c. c. 50	0 c. c. 25	0 c. c. 1
874	Peau nette.	Peau nette.	Peau nette.	Peau nette.	Peau nette.
862	Peau nette.	Peau nette.	Peau nette.	Tache violette.	Escarre.
861	Peau nette.	Peau nette.	Tache violette.	Tache violette.	Escarre.
866	Peau nette.	Peau nette.	Tache violette.	Tache violette.	Escarre.
875	Peau nette.	Peau nette.	Peau nette.	Escarre.	
876	Peau nette.	Peau nette	Peau nette.	Escarre.	
870	Peau nette.	Escarre.			

Il est à signaler que le sérum antivipérin n'empêche nullement la formation de l'œdème local.

Il serait purement illusoire d'essayer de fixer une valeur numérique aux données fournies par cette méthode de titrage, mais on peut cependant s'appuyer sur les résultats enregistrés pour classer les sérums antivipérins dans un ordre correspondant à la faculté plus ou moins grande qu'ils possèdent de neutraliser le poison nécrosant.

Sur cette base, le sérum n° 874 devrait être considéré comme étant de beaucoup le plus actif, puis viendraient, à peu près sur le même pied, les sérums 862, 876 et 875, ensuite les sérums 861 et 866, enfin, en dernier, le sérum 870, classement correspondant sensiblement à celui qui procède des indications fournies par les épreuves intraveineuses réalisées chez le lapin, dont il ne diffère que par le rang du sérum n° 875.

EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS.

Nous jugeons inutile de consigner les diverses tentatives effectuées pour apprécier l'action antitoxique de nos sérums par injection à la souris.

Les résultats incohérents ou paradoxaux des essais réalisés, soit par la voie veineuse, soit par la voie sous-cutanée, montrent que la souris blanche ne se prête pas au titrage des sérums antivipérins.

Détermination du pouvoir anticoagulant.

Kanthack, en 1896, Stephens et Myers, en 1898, démontrent que la propriété anticoagulante du venin de Cobra est neutralisée par le sérum anticobraïque. Pour Arthus (1911), l'effet inhibiteur des sérums antivenimeux à l'égard des pouvoirs coagulant et anticoagulant des venins serait spécifique. Hous-saye, Negrete et Sordelli vérifient bien, en 1919, l'action empêchante des sérums antivenimeux mais ces auteurs constatent que l'effet neutralisant, sans s'étendre à toutes sortes de venins, n'est cependant pas limité au venin qui a servi à obtenir le sérum.

Pour mettre en évidence et mesurer le pouvoir neutralisant des sérums antivipérins vis-à-vis des ferments coagulant et anticoagulant du venin de *Vipera aspis*, nous avons modifié ainsi qu'il suit la technique utilisée pour la détermination des pouvoirs coagulant et anticoagulant.

TECHNIQUE. — *Réactifs.* — 1° Sérum de cheval normal citraté ;
2° Sérum antivipérin citraté étendu au 1/3, au 1/50, au 1/500 avec le sérum normal citraté ;
3° Solution de venin de vipère au 1/1.000 ;

4° Solution de chlorure de calcium au 1/100.

Procédé. — Dans une batterie de 9 tubes à hémolyse stérilisés, on verse, avec la pipette compte-gouttes, successivement : III gouttes, VII gouttes, X gouttes de chacune des dilutions de sérum antipépérin (citraté au 1/5, au 1/50, au 1/500) de manière à obtenir, dans la série des tubes, des quantités croissantes de sérum, soit : 0 c. c. 0003, 0 c. c. 0007, 0 c. c. 001, 0 c. c. 003, 0 c. c. 007, 0 c. c. 01, 0 c. c. 03, 0 c. c. 07, 0 c. c. 1.

On complète le volume au 1/2 cent cube, dans chaque tube, en ajoutant le nombre de gouttes nécessaires de sérum de cheval normal citraté.

On ajoute, dans chaque tube, V gouttes de la solution de venin au 1/1.000.

Après mélange, on place les tubes à l'étuve à 37° pendant une demi-heure, pour permettre la fixation de l'anticorps sur l'antigène.

Deux tubes contenant tous deux X gouttes de sérum normal citraté, l'un V gouttes de la solution de venin au 1/1.000, l'autre V gouttes d'eau physiologique, servent de témoins.

On verse ensuite, dans chaque tube, 2 cent. cubes de plasma de cheval citraté et le nombre de gouttes de CaCl_2 (déterminé dans un essai préalable, comme il a été dit à propos du titrage du pouvoir coagulant du venin) nécessaire pour obtenir la coagulation du plasma en deux heures. On reporte les tubes à l'étuve à 37° et on procède à la lecture de la réaction, après une demi-heure et après deux heures.

Le tableau ci-dessous indique les résultats obtenus avec les sérums antivenimeux éprouvés :

TABLEAU V.

	DOSES de sérum anti mises en contact avec V gouttes de venin d'Aspis au 1/1000 avant l'addition du plasma, en centimètre cube	RÉSULTATS APRÈS 30 MINUTES DE SÉJOUR A L'ÉTUVE						
		S66	S62	S70	S74	S61	S76	S75
1	0,1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,07	0	0	0	0	0	0	0
3	0,03	0	0	0	0	0	0	0
4	0,01	c	0	0	0	0	0	0
5	0,007	c	c	0	0	0	0	0
6	0,003	c	C	c	0	0	0	0
7	0,001	c	C	c	c	0	0	0
8	0,0007	c	C	c	c	c	0	0
9	0,0003	c	C	c	c	c	c	0

Témoin 1, X gouttes de sérum normal + V gouttes de venin d'Aspis au 1/1000 = C.
Témoin 2, X gouttes de sérum normal + V gouttes d'eau physiologique = 0.
C. coagulation massive; c, coagulation partielle; 0, absence de coagulation.

Dans la méthode de titrage ci-dessus, la quantité fixe de venin employée en guise d'antigène (0 milligr. 25) est deux

cent cinquante fois plus forte que celle (0 milligr. 001) qui eût été suffisante (*vide supra*) pour produire la coagulation du plasma utilisé comme test de la réaction. Adoptant cette dernière dose pour *unité coagulante* du venin de vipère et, pour *unité anticoagulante*, le volume de sérum antivenimeux capable de neutraliser mille unités coagulantes, l'indice du pouvoir anticoagulant du sérum nous sera donné par le nombre d'unités anticoagulantes contenu dans 1 cent. cube. Suivant cette convention, l'activité anticoagulante des sérums antivipérins serait indiquée, en chiffres ronds, par les valeurs suivantes : n° 866 = 800 ; n° 862 = 2.500 ; n° 870 = 3.500 ; n° 874 = 8.000 ; n° 861 = 25.000 ; n° 876 = 35.000 ; n° 875 = 80.000.

Détermination du pouvoir antihémolytique.

A. Calmette (1895) — Stephens et Myers (1898) — Stephens (1900) ont reconnu l'action antagoniste que les sérums antivenimeux exercent à l'égard de l'hémolyse provoquée par les venins en présence de sérum.

A. Calmette et Noc (1904) pensaient que l'activité antitoxique *in vivo* d'un sérum antivenimeux pouvait être mesurée par son pouvoir antihémolytique *in vitro*. En 1911, Delezenne montre que les sérums antivenimeux n'empêchent pas l'hémolyse des globules rouges lorsque la lysocithine est formée, mais qu'ils neutralisent la diastase qui dédouble la lécithine en lysocithine.

Houssaye et Negrete (1922) montrent que le pouvoir antihémolytique, tout en dénotant une certaine spécificité de groupe, est l'action neutralisante la moins spécifique des sérums antivenimeux.

Pour évaluer le pouvoir antihémolytique des sérums antivenimeux, nous avons utilisé la technique suivante :

TECHNIQUE. — *Réactifs*. — 1° Sérum de cheval normal chauffé à 56° pendant une demi-heure ;

2° Dilutions au 1/100, au 1/500, au 1/5.000 du sérum antivenimeux chauffé à 56° dans le sérum normal chauffé ;

3° Solution de venin de vipère au 1/100.000 ;

4° Suspension de globules de cheval lavés à 5 p. 100.

Procédé. — On verse, dans une série de tubes à hémolyse stérilisés :

1° Dans chaque tube, respectivement, III gouttes, VII gouttes et X gouttes

des dilutions de sérum au 1/5.000 et au 1/500, puis V gouttes et X gouttes de la dilution au 1/100, soit, dans la série : 0 c. c. 00001, 0 c. c. 00003, 0 c. c. 00007, 0 c. c. 0001, 0 c. c. 0003, 0 c. c. 0007, 0 c. c. 001, 0 c. c. 0025, 0 c. c. 005 de sérum antivenimeux ;

2° Le volume est complété à 0 c. c. 5 dans chacun des tubes, en ajoutant le nombre de gouttes nécessaire de sérum de cheval normal chauffé ;

3° On ajoute, dans chaque tube, V gouttes de la solution de venin de vipère au 1/100.000.

On mélange et on place à l'étuve à 37° pendant une heure.

Au sortir de l'étuve, on ajoute, dans chaque tube, 1 cent. cube de suspension de globules rouges de cheval refroidie et on les place dans un bain de glace fondante.

La lecture de la réaction se fait au bout d'une demi-heure.

Les réactions obtenues avec les sérums antivipérins éprouvés sont consignées dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU VI.

	DOSES de sérum anti mises en contact 1 heure à 37° avec V gouttes de venin d'Aspis au 1/100.000 avant l'addition de globules rouges, en centimètre cube	RÉSULTATS APRÈS 30 MINUTES À 0°						
		862	861	870	866	875	876	874
1	0,005	0	0	0	0	0	0	0
2	0,0025	h	0	0	0	0	0	0
3	0,001	h	0	0	0	0	0	0
4	0,0007	H	h	h	h	h	h	0
5	0,0003	H	H	H	H	H	H	h
6	0,0001	H	H	H	H	H	H	H
7	0,00007	H	H	H	H	H	H	H
8	0,00003	H	H	H	H	H	H	H
9	0,00001	H	H	H	H	H	H	H

Témoin 1, sérum normal + V gouttes de venin Aspis au 1/100.000 = H.
Témoin 2, sérum normal + V gouttes eau physiologique = 0.
H, Hémolyse totale; h, hémolyse partielle; 0, absence d'hémolyse.

Nous avons vu plus haut qu'il suffisait de 0 milligr. 0005 de venin de vipère agissant à 37° sur 1/2 cent. cube de sérum de cheval pour engendrer la quantité de lysocythine susceptible de lyser, à 0°, 1 cent. cube de globules rouges de cheval à 5 p. 100. Cette quantité de venin que nous pouvons prendre comme *unité lysocythinogène* est contenue cinq fois dans la dose (0 milligr. 0025) utilisée dans notre méthode de titrage.

Si nous prenons comme unité d'anticorps le volume de sérum antivenimeux nécessaire pour neutraliser une unité lysocythi-nogène, l'activité antihémolytique des sérums antivipérins titrés, rapportée au centimètre cube, sera donnée par les valeurs suivantes : 862 = 1.000 ; 861 = 2.000 ; 870, 866, 875 et 876 = 5.000 ; 874 = 7.000.

Pouvoirs précipitant et floculant des sérums antivipérins.

Dès 1902, Lamb signalait que le sérum de lapins immunisés contre le venin de cobra précipitait les solutions de ce venin. Peu après, Flexner et Noguchi indiquaient qu'aucune relation n'existe entre le pouvoir précipitant d'un sérum antivenimeux et son pouvoir antitoxique. En 1907, Calmette et Massol montraient que le mélange de venin de cobra et de sérum anticobraïque en proportions convenables donne lieu à la formation d'un précipité privant le mélange de ses propriétés toxiques, constatation qui pouvait servir de base, semblait-il, à une méthode de titrage du pouvoir antivenimeux du sérum.

Houssaye et Négrete (1917) trouvent que l'action antitoxique d'un sérum antivenimeux et son effet précipitant ne vont pas toujours de pair, mais ils notent cependant que les sérums très actifs au point de vue antitoxique possèdent souvent un fort pouvoir précipitant. Toutefois, pour ces auteurs, les précipitines des sérums antivenimeux ne seraient pas rigoureusement spécifiques. En 1928, A. Boquet montre que le sérum de lapins traités par du venin de cobra préalablement dénué de sa toxicité par adsorption au contact de poudre de charbon, provoque cependant une floculation lorsqu'il est mélangé à une solution de venin de cobra.

La plupart des sérums antivipérins utilisés au cours de nos recherches se sont montrés doués de la propriété de précipiter et de floculer en présence d'une solution de venin de vipère, précipitation et floculation n'apparaissant toutefois que dans les mélanges où les deux réactifs, sérum et venin, se trouvent dans des rapports définis de concentration, lesquels varient, dans des limites plus ou moins étendues, selon les sérums.

L'existence dans les venins de serpents de ferments liquéfiant la gélatine rendant l'application de la technique indiquée par M. Nicolle, Césari et Debains impraticable, nous avons simplement mis en œuvre, pour la mesure du pouvoir précipitant des sérums antivenimeux, la méthode des mélanges, en faisant varier, d'un côté la quantité de sérum vis-à-vis d'une dose constante de venin; de l'autre, la quantité de venin vis-à-vis d'une dose constante de sérum. Cette façon de procéder était nécessaire pour étendre suffisamment les marges de la réaction, étant donné que les solutions concentrées de venin de Vipère aspic ne peuvent être employées en raison de leur opalescence marquée.

Par ailleurs, le choix de la technique adoptée offrait l'avantage de permettre d'apprécier en même temps le phénomène de la floculation dans des conditions se rapprochant de celles qui entrent en jeu dans la réaction de Ramon.

TECHNIQUE. — Dans une série de tubes à hémolyse, stériles, on verse dans chacun des cinq premiers tubes 1 cent. cube de solution de venin au 1/100, puis successivement dans les quatre suivants, des doses décroissantes, soit 0 c. c. 75, 0 c. c. 50, 0 c. c. 25, 0 c. c. 01 de la même solution. On complète le volume à 1 cent. cube par addition d'eau physiologique dans les tubes où cela est utile. On ajoute alors dans les cinq derniers tubes, uniformément, 1 cent. cube du sérum à titrer, puis, dans les autres tubes, en allant vers le premier, successivement, 0 c. c. 75, 0 c. c. 50, 0 c. c. 25, 0 c. c. 1 du même sérum antivipérin, le volume étant ensuite égalisé par addition de sérum normal dans les quatre premiers tubes, soit 0 c. c. 9 dans le premier, 0 c. c. 75 dans le deuxième, 0 c. c. 5 dans le troisième, 0 c. c. 25 dans le quatrième.

On prend soin d'opérer le mélange dans chaque tube, par renversement, sitôt qu'on a versé le sérum antivipérin.

Pour l'appréciation du pouvoir *précipitant*, la lecture se fait au bout d'une heure en notant le dernier tube dans lequel s'est manifesté un trouble appréciable.

Pour l'évaluation du pouvoir *floculant*, on note, sans tenir compte du facteur temps, le premier tube dans lequel apparaissent, en suspension dans le liquide, des flocons visibles à l'œil nu.

Les résultats de nos constatations sont indiqués dans le tableau VII.

Notons que le sérum n° 866 n'a provoqué ni précipitation ni floculation et que le sérum n° 876 n'a fourni qu'une très légère précipitation, discontinue et non accompagnée de floculation.

Pour les autres sérums, les réactions de précipitation et de

TABLEAU VII.

SÉRUM antivenimeux en cent. cube	VENIN de vipère en gramme	RAPPORT Venin Sérum	SÉRUMS ANTIVIPÉRINS					
			861	862	866	874	875	876
0,1	0,01	1/10	0	0	0	0	0	0
0,25	0,01	1/25	0	0	0	0	0	0
0,50	0,01	1/50	<i>p</i>	<i>p</i>	0	<i>p</i>	0	<i>p</i>
0,75	0,01	1/75	<i>p</i>	<i>p</i>	0	P-Fi	0	0
1	0,01	1/100	P-Fi	P	0	P	<i>p</i>	0
1	0,0075	1/133	<i>p</i>	P	0	P	<i>p</i>	0
1	0,005	1/200	<i>p</i>	P-Fi	0	P	<i>p</i> -Fi	<i>p</i>
1	0,0025	1/400	0	<i>p</i>	0	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
1	0,001	1/1000	0	0	0	0	0	0

p. légère opacification; P, précipitation nette; Fi, floculation initiale.

floculation se sont manifestées très nettement, avec des intensités différentes.

Si l'on interprète les résultats de la floculation suivant les enseignements de la méthode de Ramon, les sérums n° 862 et n° 875 devraient être considérés comme les plus actifs, viendraient ensuite le sérum n° 861 et enfin le sérum n° 874.

D'après les indications de la précipitation interprétées dans le sens de la méthode de M. Nicolle, Césari et Debains, les sérums n° 862, n° 875 et n° 874 se classeraient en tête de liste, sur un rang d'égalité, suivis du sérum n° 861.

*
* *

On ne saurait évidemment comparer entre elles des valeurs établies par des systèmes de mesure dissemblables et reposant sur des unités spécifiques complètement différentes. Toutefois, il tombe sous le sens que s'il existait, entre deux valeurs exprimant des propriétés distinctes des sérums antivenimeux, un rapport constant, autorisant l'évaluation réciproque de l'un des pouvoirs en fonction de l'autre, le classement d'un ensemble de sérums par rang de qualité traduit par les fluctuations de l'une de ces valeurs serait le même que le classement fondé sur les variations de l'autre.

Or, en confrontant les classements par ordre de valeur,

obtenus sur la base des diverses méthodes de titrage mises parallèlement en œuvre au cours de nos essais, on ne constate pas cette concordance.

Considérant que les résultats du titrage *in vivo* effectué chez le lapin, par voie veineuse, nous donnent la mesure des propriétés antitoxiques générales des sérums éprouvés et constituent par conséquent le critérium de leur valeur thérapeutique, nous devons conclure que ni le pouvoir anticoagulant, ni le pouvoir antihémolytique, ni le pouvoir précipitant, ni le pouvoir floculant des sérums qui ont fait l'objet de nos recherches ne correspondent au pouvoir antitoxique et que les déterminations de ces pouvoirs par les méthodes de titrage *in vitro* employées par nous ne sont susceptibles d'apporter aucune indication utile concernant l'activité des sérums antivipérins à l'égard des effets pathogènes du venin de *Vipera aspis*.

SUR LA NATURE DES AGGLUTINOGENES DES GLOBULES ROUGES DES DIFFERENTS GROUPES

par R. DUJARRIC DE LA RIVIERE et N. KOSSOVITCH.

Si l'agglutination des hématies par les sérums correspondants est un phénomène facile à réaliser et connu depuis longtemps, le mécanisme de ce phénomène demeure l'une des questions les plus obscures de la Biologie. L'agglutination résulte d'un processus physico-chimique très compliqué. La difficulté s'augmente encore du fait de la structure très complexe, et du reste mal connue, des éléments (agglutinines du sérum et agglutinogènes des globules rouges) qui entrent en réaction. Nous nous sommes proposé d'étudier la nature et les propriétés de l'un de ces éléments : l'agglutinogène des globules rouges.

Au cours de nos recherches sur les groupes sanguins et en particulier sur le pouvoir antigénique des globules rouges des différents groupes, nous avons été amenés à étudier la nature et les propriétés physico-chimiques des isohémoagglutinogènes [8]. Nous avons montré que ces agglutinogènes sont fixés sur le stroma des globules.

Mais le stroma globulaire est un complexe d'éléments fort divers. Désirant poursuivre nos recherches en utilisant des agglutinogènes aussi purifiés que possible, nous nous sommes tout d'abord efforcés d'isoler, des autres substances du stroma, ces agglutinogènes dont nous avons ensuite étudié certaines propriétés physiques et chimiques.

PRÉPARATION DE L'EXTRAIT GLOBULAIRE.

Des travaux récents, — et en particulier ceux de Landsteiner [11] et de Witebsky [16] — ont montré que les aggluti-

Les numéros en caractères gras renvoient à l'index bibliographique.

nogènes spécifiques peuvent être extraits du stroma globulaire par l'alcool, mais que si cet extrait possède le pouvoir agglutinant *in vitro*, injecté au lapin, il ne provoque pas à lui seul la formation d'anticorps spécifiques. Pour obtenir ces anticorps, il faut, avant l'injection, mélanger l'extrait avec un sérum, particulièrement le sérum de porc. L'extrait alcoolique de globules rouges serait de nature lipoïdique et constituerait une sorte d'antigène privé de sa fonction immunisante, ce serait un « haptène » suivant la conception de Landsteiner.

Mais l'extraction par l'alcool ne permet pas d'obtenir l'agglutinogène à l'état pur; il reste une certaine quantité de matières protéiques. Pour pousser plus loin la purification nous avons, sur les conseils de M. le Dr Machebœuf (1), soumis les globules rouges successivement à l'action de l'alcool, de l'éther et de l'acétone. Voici la technique que nous avons employée :

1° EXTRACTION PAR L'ALCOOL. — Le sang est recueilli dans un tube. Après coagulation, le caillot, séparé du sérum — dont le groupe sanguin a été préalablement déterminé — est lavé à trois ou quatre reprises dans l'eau physiologique. La purée de globules, ainsi obtenue, est mélangée à 8 parties d'alcool absolu ou à 10 parties d'alcool à 95. Le mélange est agité, par intervalles, durant plusieurs heures, puis laissé, pendant vingt-quatre à quarante-huit heures, à la température du laboratoire. Il est nécessaire de bien boucher le flacon pour que l'oxygène de l'air ne provoque pas d'oxydation; la meilleure méthode consiste à laisser le mélange dans une atmosphère d'azote. On filtre le mélange sur un filtre ordinaire; on évapore le filtrat dans le vide en chauffant doucement — à 37° — le ballon dans lequel on fait le vide. On reprend ensuite par l'eau physiologique la masse jaune brunâtre qui reste au fond du récipient.

Cet extrait alcoolique contient les agglutinogènes spécifiques des groupes. Il est facile de le démontrer en utilisant la méthode de l'adsorption (la méthode directe d'agglutination n'est plus possible puisque les globules rouges ont été détruits). Si, en effet, on mélange une quantité suffisante de l'extrait avec

(1) Auquel nous adressons nos vifs remerciements.

l'agglutinine correspondante (A avec α , B avec β), on constate l'adsorption (la fixation) de l'agglutinine, complète si la quantité d'extrait employé correspond à la teneur du sérum en agglutinines, incomplète si cette quantité est inférieure.

2° EXTRACTION PAR L'ÉTHER ET L'ACÉTONE. — Lorsque l'on a évaporé l'alcool de l'extrait globulaire, préparé comme nous venons de le dire, on peut constater que ce résidu est complètement soluble dans l'eau et dans l'alcool, mais ne l'est que partiellement dans l'éther.

Faisons donc agir l'éther sur l'extrait sec (obtenu après évaporation de l'alcool). Une partie de l'extrait est solubilisée, mais nous constatons qu'il reste une partie insoluble. Séparons la solution éthérée et évaporons l'éther. Reprenons le résidu obtenu par l'eau physiologique comme précédemment et mettons-le en contact avec le sérum correspondant. L'adsorption des agglutinines a lieu. L'éther a donc dissout, dans le résidu laissé par l'alcool, la partie qui contient l'agglutinogène.

Il reste une partie insoluble, sans intérêt pour nous, puisqu'elle ne contient pas d'agglutinogène et dont nous pouvons nous débarrasser en faisant agir l'acétone. Pour cela, on reprend, par un mélange à parties égales d'éther et d'eau distillée, la masse obtenue en faisant agir l'alcool sur les globules rouges puis en éliminant l'alcool par évaporation. On porte alors le mélange dans un entonnoir à décantation. On agite soigneusement; puis on laisse le mélange au repos pour que la décantation se produise. Dans l'entonnoir, il se forme alors deux couches: l'éther à la partie supérieure, l'eau à la partie inférieure. On élimine l'eau en ouvrant le robinet de l'appareil. Au mélange éthéré qui est resté dans l'entonnoir, on ajoute trois volumes d'acétone; on mélange soigneusement. Il se forme un précipité floconneux. On utilise la centrifugation pour recueillir le précipité obtenu. Le culot de centrifugation est constitué par une masse de phosphatides qui contient les agglutinogènes dont nous avons constaté la présence par l'adsorption des agglutinines comme précédemment.

Ces expériences prouvent que l'on peut utiliser pour l'étude des agglutinogènes des extraits de globules qui sont d'une

préparation et d'un maniement faciles et qui peuvent être obtenus et conservés en quantités importantes pour les besoins de l'expérimentation.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES AGGLUTINOGENES.

Dans ce premier travail, nous avons étudié les questions suivantes : action sur les agglutinogènes de la température et des rayons ultra-violet ; tension superficielle ; adsorption par des substances adsorbantes non spécifiques (kaolin, charbon, hydroxyde d'aluminium) ; propriétés biochimiques.

1° INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LES AGGLUTINOGENES. — Pour cette recherche, nous avons employé la technique suivante : 0 gr. 05 d'extrait sec est dissous dans 10 cent. cubes d'alcool à 96°, mélangé à 100 cent. cubes d'eau puis chauffé au bain-marie à 100° pendant plusieurs heures (chauffage discontinu mais représentant au total une durée de vingt-quatre heures). Si, après ce chauffage, on pratique l'expérience d'adsorption de l'agglutinine par l'extrait, on constate que l'agglutinogène n'est pas détruit ; le sérum perd son agglutinine complètement ou partiellement, suivant les proportions du mélange comme nous l'avons déjà indiqué. Ces expériences répétées avec les sérums des différents groupes nous ont montré que les agglutinogènes A, B et AB gardent leur pouvoir d'adsorption d'une façon égale.

2° ACTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS. — Les expériences que nous avons pratiquées nous ont montré que les agglutinogènes sont réfractaires à l'action des rayons ultra-violet. Pour le démontrer nous avons opéré de la façon suivante : un poids déterminé d'extrait globulaire est dissous dans 10 à 15 volumes d'eau physiologique. Après l'action des rayons ultra-violet, nous avons desséché la solution et répété l'expérience d'adsorption des agglutinines ; nous avons constaté que les agglutinogènes spécifiques des groupes conservent leur pouvoir agglutinant et que le titre des agglutinines reste le même dans la presque totalité des cas. Rappelons que Schröder [15], étudiant les propriétés chimiques et physiques des agglutinines a trouvé de

même que les agglutinines spécifiques des groupes sont réfractaires à l'action des rayons ultra-violet.

3° EXPÉRIENCE D'ADSORPTION DES AGGLUTINOGENES PAR DES SUBSTANCES NON SPECIFIQUES. — Il nous a paru intéressant de rechercher si les agglutinogènes des différents groupes sont adsorbés par le kaolin, le charbon, l'hydroxyde d'aluminium.

Dans ce but, on prépare une suspension de l'extrait globulaire dans l'eau distillée (0 gr. 05 pour 20 cent. cubes). On met cette suspension au contact de 1 cent. cube d'une suspension à 5 p. 100 de kaolin. On mélange soigneusement. On centrifuge. Le liquide surnageant est soumis à l'épreuve de l'adsorption des agglutinines; dans aucun cas on ne constate la présence d'agglutinogène. Le culot de centrifugation est repris par 10 cent. cubes d'alcool à 96°; après mélange soigneux, on filtre et, du filtrat, on élimine l'alcool par évaporation. Le résidu obtenu est repris par l'eau physiologique; l'épreuve de l'adsorption montre qu'il contient les agglutinogènes. Nous avons utilisé la même technique pour les essais d'adsorption par l'hydroxyde d'aluminium et nous avons obtenu les mêmes résultats.

Ces expériences prouvent que les agglutinogènes sont adsorbés par le kaolin et l'hydroxyde d'aluminium mais qu'ils peuvent être récupérés en traitant par l'alcool la substance adsorbante.

Les expériences pratiquées dans les mêmes conditions avec du charbon nous ont donné des résultats intéressants. Nous avons constaté que les agglutinogènes des groupes A, B et AB se comportent différemment. Le charbon n'adsorbe pas l'agglutinogène A; celui-ci se retrouve dans le liquide surnageant après centrifugation. L'agglutinogène B, au contraire, est adsorbé complètement ou en partie par le charbon. Les résultats sont les mêmes quand on expérimente avec l'agglutinogène combiné AB. Dans ce dernier groupe l'agglutinogène A n'est pas adsorbé tandis que B l'est partiellement ou totalement.

Ces expériences d'adsorption montrent qu'il existe une différence très nette dans la façon dont se comportent respectivement les agglutinogènes A et B. Or, Landsteiner a montré

que la spécificité des antigènes est en rapport direct avec leur constitution chimique; des antigènes identiques ont une composition chimique identique. En appliquant cette donnée au cas qui nous occupe, nous pouvons penser que pour les deux caractères morphologiques des haptènes (agglutinogènes) spécifiques A et B, la spécificité d'espèce et la convergence des caractères reposent sur la spécificité de leur constitution chimique. Il est possible qu'il existe dans nos extraits globulaires un mélange de différents lipoides; que ces lipoides existent en combinaisons moléculaires différentes suivant les groupes et que ce fait conditionne les réactions immuno-biologiques qui permettent d'identifier les différents groupes sanguins.

5° DÉTERMINATION DE LA TENSION SUPERFICIELLE. — La mesure de la tension superficielle a été faite par M. Lecomte du Noüy (1) suivant sa technique bien connue.

On a mesuré la tension superficielle de l'extrait repris par l'eau et, par comparaison, celle du mélange de l'extrait avec le sérum correspondant.

La technique a été la suivante :

a) *Tension superficielle de l'extrait* : 0 gr. 03 de l'extrait d'un groupe déterminé et dissous dans 10 cent. cubes d'eau de robinet; — b) *Tension superficielle du sérum seul*; — c) *Tension superficielle du mélange sérum extrait*. — 0 gr. 03 d'extrait sont mélangés à 0 c.c. 3 de sérum et on ajoute au mélange 10 cent. cubes d'eau

Voici les chiffres moyens obtenus :

GROUPE SANGUIN	EXTRAIT	EXTRAIT + SÉRUM	SÉRUM
AB	66,4	49,0	41,7
A	65,5	42,6	41,8
B	64,4	42,0	40,5
O	59,1	42,1	40,1

Eau du robinet : 75,7.

Les chiffres obtenus montrent que le sérum a une tension superficielle inférieure à celle de l'extrait; le mélange sérum + extrait donne un complexe colloïdal qui a un chiffre de tension superficielle différent à la fois de celui de chacun des deux

(1) Nous adressons à M. Lecomte du Noüy nos vifs remerciements.

facteurs entrant dans la combinaison et de celui que l'on obtiendrait en faisant la somme des chiffres caractérisant chacun de ces facteurs.

6° PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES DES EXTRAITS CONTENANT LES AGGLUTINOGENES. — Les expériences que nous venons de rapporter ont montré que l'extrait globulaire que nous préparons contient l'agglutinogène, qu'il est probablement de nature lipoidique et qu'il se trouve contenu dans la fraction phosphatidique des stromas. Les expériences d'adsorption par des corps adsorbants non spécifiques ont établi qu'il existe une différence entre les agglutinogènes A et B. On peut supposer que la lécithine existant dans les globules rouges des différents groupes est mélangée en proportions variables avec d'autres lipoides et des matières protéiques. Ces considérations nous ont incités à étudier quelques propriétés bio-chimiques des récepteurs A, B, AB, O.

Nous avons d'abord cherché à caractériser l'albumine dans les extraits de globules des différents groupes. Toutes les réactions : biuret, réaction xanthoprotéique, réaction de Millon, ont été négatives avec les extraits de tous les groupes.

La méthode de Lieberman a montré d'autre part que les agglutinogènes A, B, AB et O ne contiennent pas de cholestérol.

L'extrait globulaire sur lequel nous avons expérimenté est donc de nature phosphatidique et ne contient ni albumine ni cholestérol.

Nous avons cherché aussi par la technique de Bell et Doisy [2] modifiée par Briggs [4] la présence de phosphore lipidique dans les extraits de différents groupes; nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence sensible dans la quantité de phosphore contenu dans les extraits globulaires de chacun des différents groupes; cette quantité est de 8 millig. 48 et 8 millig. 64 pour 100 cent. cubes de globules rouges. [1].

Les phosphatides sont nombreux; les lécithines peuvent différer par les acides gras saturés et non saturés qui entrent dans leur composition et qui peuvent être caractérisés par l'indice d'iode ou indice de Hübl. Nous avons employé la méthode décrite par G. Bertrand dans son Manuel [3] pour déterminer l'indice d'iode dans nos extraits. Nous avons

trouvé des chiffres différant très sensiblement pour les différents groupes O (81,6), AB (57,8), A (79,6) et B (75,5), le poids de la masse examinée étant la même.

Les phosphatides existant dans les extraits des globules rouges des différents groupes sanguins — ou agglutinogènes des groupes — diffèrent donc par leurs indices d'iode. Cette différence indique que les fractions lipoidiques contenant les agglutinogènes présentent un mélange d'acides gras saturés et non saturés en proportions différentes. Cette différence quantitative est peut-être un des facteurs conditionnant la spécificité des agglutinogènes des groupes sanguins. Mais la purification des extraits contenant les agglutinogènes n'est pas poussée assez loin pour permettre une conclusion ferme à ce sujet.

Il est possible que les lécithines jouent un rôle important dans l'action des agglutinogènes des différents groupes. Dans le si remarquable rapport qu'il a présenté au 1^{er} Congrès International de Microbiologie sur « les lipoides dans l'hémolyse », M. le Professeur S. Belfanti [4] a très justement insisté sur le fait que des lécithines qui ne sont pas hémolytiques pour les globules rouges le deviennent lorsqu'elles subissent par un phénomène d'hydrolyse (lécithinase) une dégradation de leur état moléculaire en devenant de véritables hémolysines ou lysocithines de Delezenne et Fourneau [5] (travaux de Delezenne, Fourneau, Suzanne Ledebt [6]).

Dans le cas de l'agglutination des globules rouges par les sérums, un dédoublement d'un type analogue à celui dont nous venons de parler, joue peut-être un rôle dans l'action des agglutinogènes.

Quant au sérum agglutinant il jouerait le rôle de catalyseur. On sait qu'en 1902, Flexner et Noguchi [9] ont montré que les globules rouges bien centrifugés, soigneusement, lavés, puis mis en suspension dans l'eau physiologique ne sont pas hémolysés par le venin du serpent. Mais que l'addition d'une trace de sérum sanguin détermine très rapidement l'hémolyse.

Il est possible que des phénomènes du même ordre se passent dans l'agglutination des globules par les sérums des différents groupes ; c'est le sujet actuel de nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELFANTI (S.), Les lipoides dans l'hémolyse. *C. R. 1^{er} Congrès intern. de Microb.*, 2, Masson édit., Paris, 1930, p. 3-21.
- [2] BELL et DOISY. *Journ. Biol. Chem.*, 44, 1920.
- [3] BERTRAND et THOMAS (P.), Guide pratique des travaux de chimie biologique, 1913, édit. Dunod et Pinat, p. 180-182.
- [4] BRIGGS, *Journ. Biol. Chem.*, 53, 1922.
- [5] DELEZENNE et FOURNEAU. *Bull. Soc. Chim. de France*, 15, 1914, 421.
- [6] DELEZENNE et LEDEBT (S.), *C. R. Acad. des Sciences*, 20 mars et 8 juillet 1911; 25 nov. 1912.
- [7] DESSY. Recherche sull'immunita à antilipoïdea. *C. R. 1^{er} Congrès Inter Microb.*, 2, 1930.
- [8] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSOVITCH (N.). *Ces Annales*, 44, 1920, p. 107.
- [9] FLEXNER et NOGUCHI. *Journ. exper. Med.*, 1092, n° 3.
- [10] GREENFIELD. *Zeitsch. für Immunit.*, 56, 1927.
- [11] LANDSTEINER. *Bioch. Zeitschr.*, 119, 1921 Bd. 119.
- [12] MACHEBOEUF. Recherches sur les lipides, Laval, 1928.
- [13] SACHS. Die Lipoide in der Immunität, I. *C. R. Congrès Intern. de Microb.*, 2, 1930, p. 24.
- [14] SCHIFF et ADELSBERGER, *Zeitschr. f. Immunit.*, 40, 1926.
- [15] SCHRÖDER. *Bioch. Zeitschr.*, 195; *Zeitschr. für Immunit.*, 65, 1930; *Pflügers Archiv.*, 215.
- [16] WITEBSKY. *Ergebnisse der Physiologie*, 34, 1932.

LES MODALITÉS ATYPIQUES DE L'INFECTION TRYPANOSOMIENNE CYCLIQUE CHEZ LES GLOSSINES

par E. ROUBAUD.

Depuis l'époque (1908) où j'ai fait connaître le rôle joué par la salive des Glossines comme milieu de conservation, d'attente et de transformation crithidienne des trypanosomes pathogènes d'espèces diverses, depuis les recherches mémorables de Kleine (1909) qui, pour la première fois, ont appelé l'attention sur le caractère durable du pouvoir infectant des Glossines, de nombreux travaux ont permis de préciser le siège et le mode de l'évolution cyclique propre aux différents virus.

On s'accorde actuellement à distinguer pour cette évolution : l'évolution salivaire labro-hypopharyngienne primaire ou directe qui caractérise les trypanosomes du groupe *vivax-cazaboui*, l'évolution labro-hypopharyngienne *secondaire* ou indirecte qui est propre au groupe *congolense-dimorphon* ; enfin l'évolution salivaire profonde, également indirecte ou *secondaire*, qui est spéciale aux virus polymorphes *gambiense*, *rhodesiense*, *brucei*.

N'y a-t-il que ces trois différentes modalités, ou mieux, dans les trois groupes, le mode évolutif des formes infectieuses est-il absolument immuable ? C'est ce que je désire examiner ici, en reprenant des observations déjà anciennes puisqu'elles datent de l'époque (1910-1913) où j'ai pu poursuivre, avec G. Bouet, des recherches sur l'infection trypanosomienne des différentes espèces de Glossines de l'Ouest africain.

Au cours de ce long travail de prospection qui nous a amenés à faire connaître le mode évolutif des différents virus animaux propagés par différentes espèces de tsé-tsés dans les colonies de l'Afrique occidentale française, certaines observations sont demeurées dans l'ombre ou n'ont été que sommairement décrites. Je désire ici y revenir et les discuter à l'appui

de certaines données publiées récemment par les auteurs, et notamment par H.-L. Duke qui a, dans ces dernières années, apporté une solide contribution à l'histoire si complexe du rôle infectant des tsé-tsés.

I. — *Trypanosoma cazalboui*.

Le cycle évolutif normal de ce trypanosome (1) est bien connu depuis nos recherches au Dahomey, avec Bouet (1910-I) qui ont confirmé et complété celles de Bouffard (1909-1910) au Soudan. Le développement est confiné à la trompe. Il résulte d'un processus de fixation directe immédiate des flagellés à la paroi interne du labre, au moment du repas de la mouche, lorsque le sang infecté, pris par l'insecte pendant sa succion, se trouve mélangé au liquide labial. Il n'y a généralement qu'un faible nombre de parasites, parfois un seul, qui demeure attaché à la trompe au cours du repas de sang. La fixation des flagellés s'accompagne de leur transformation très rapide en formes crithidiennes qui deviennent le siège d'une multiplication active, de manière à constituer des colonies multiples en touffes plus ou moins compactes. Au fur et à mesure que l'infection avance en âge, les crithidies tendent parfois à s'allonger jusqu'à donner naissance, dans les infections anciennes, à ces curieuses formes filamenteuses géantes que j'ai décrites dès mes premiers travaux, en 1908. Les touffes de crithidies filamenteuses sont observées assez fréquemment. Leurs oscillations en touffes d'herbe agitées par le vent, dans le liquide labial au sein duquel elles plongent, constitue une image saisissante pour l'observateur.

En même temps que s'organise et s'accroît l'infection crithidienne à l'intérieur du canal labial de la trompe, on voit l'hypopharynx envahi peu à peu dans toute son étendue par les trypanosomes salivaires (métacycliques) dont j'ai fait également connaître l'existence dans cet organe, dès mes premiers travaux, en 1908.

(1) Je conserve ici la dénomination de *cazalboui* adoptée lors de nos recherches pour ce virus. Il faut entendre évidemment sous cette dénomination le groupe *T. vivax* des auteurs.

Le schéma de cette infection directe est donné dans la figure 1. C'est celui qui correspond à l'évolution observée pour *Tr. vivax* par Bruce et ses collaborateurs, pour *Tr. uniforme* par Fraser et Duke, pour *Tr. capræ*, par Bruce, etc. Toutes ces espèces ne paraissent constituer, en raison de leur évolution labiale pure chez la Glossine, sans multiplication intestinale, qu'un seul et même type spécifique d'organismes.

Je désire ici insister sur un fait particulier, qui n'apparaît pas bien en général dans les observations des auteurs. C'est que le moment où les Trypanosomes métacycliques apparaissent dans le canal de l'hypopharynx ne coïncide pas absolument

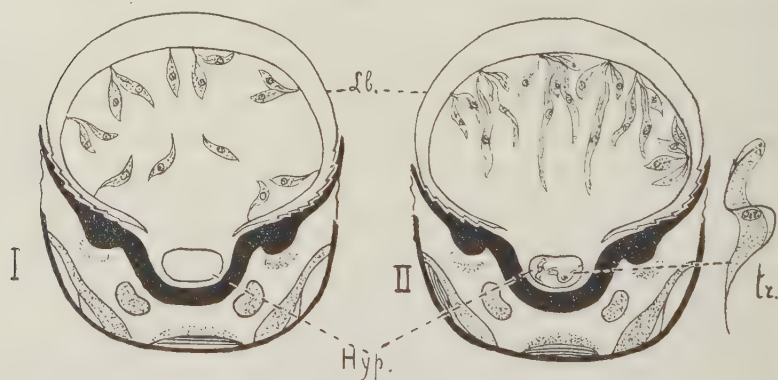


FIG. 1. — Evolution de *Tr. cazalboui* dans la trompe.

Coupes transversales schématiques.

- I. Période initiale où l'hypopharynx (*Hyp.*) n'est pas encore envahi. Le liquide salivaire ne renferme que des formes crithidiennes, fixées ou non au labre, *lb.*
- II. Période définitive. Les formes crithidiennes ont constitué des touffes denses, souvent filamenteuses. L'hypopharynx (*Hyp.*) est envahi par des trypanosomes métacycliques *tr.*

avec celui où les mouches deviennent infectantes. S'il est exact de dire que les Glossines dont l'hypopharynx est envahi sont seules capables de transmettre leur infection aux vertébrés, ainsi qu'il ressort de nos expériences initiales qui furent depuis confirmées par nombre d'expérimentateurs, on ne peut dire que la présence des trypanosomes dans l'hypopharynx confère toujours à la mouche, et d'emblée, un pouvoir infectant.

Par exemple, dans les expériences que nous avons poursuivies

au Dahomey, avec G. Bouet, nous avons remarqué que les formes métacycliques font leur apparition dans le canal de l'hypopharynx, chez *Gl. palpalis*, déjà quarante-huit heures après le repas infectant. Le quatrième jour, on les y observe parfois en assez grand nombre, comme je l'avais déjà indiqué dans mes premières expériences en Afrique Équatoriale (Roubaud, 1908), et comme il a été revu plus tard avec Bouet (1910). Cependant les animaux piqués, dans les expériences en question, ne se sont pas infectés. C'est à partir du sixième jour seulement, dans nos essais du Dahomey, que nous avons vu les mouches manifester leur pouvoir infectant pour les vertébrés. Et cependant, à ce moment des mouches sont devenues infectantes qui ne renferment encore qu'une petite quantité de virus métacyclique dans leur canal hypopharyngien.

Il semble que les flagellés doivent subir un certain temps d'accommodation au milieu Glossine avant de reprendre une certaine virulence et les phénomènes morphologiques de la transformation cyclique ne sont pas seuls à considérer dans le phénomène de retour de la virulence, pour les flagellés qui évoluent chez les mouches.

MODIFICATIONS DU TYPE DE L'INFECTION SALIVAIRE. — La question de la disparition spontanée des infections chez les Glossines a été récemment discutée par H. L. Duke (1933) qui ne l'admet que comme un phénomène très rare. Les cas que je vais examiner tout d'abord pour *Tr. cazalboui* montreront que cette désinfection est loin d'être une exception.

En 1908, lors de mes premières études sur l'infection salivaire des Glossines, j'avais établi que l'infection du canal de la trompe pouvait s'éteindre spontanément chez les mouches, au moins dans les conditions de la captivité.

Les recherches que j'ai effectuées plus tard au Dahomey m'ont confirmé dans cette manière de voir en montrant que sous l'influence du vieillissement, ou lorsqu'elles sont soumises à des conditions hygrométriques différentes de celles que supportent normalement les Glossines dans leur milieu naturel, l'infection de la trompe peut être considérablement modifiée dans sa forme et ses caractères physiologiques. Si, normalement, lorsque les mouches sont en bonnes conditions de vie,

leur infection peut s'entretenir d'une façon durable pendant toute l'existence des mouches, on peut aussi, chez des mouches soustraites à leurs conditions normales de vie, la voir disparaître plus ou moins complètement. Le cas le plus fréquent dans cette extinction partielle de l'infection est celui représenté dans la figure 2, dans lequel l'infection labiale disparaît complètement alors que l'infection hypopharyngienne est conservée.

OBSERVATION 1. — Dans une expérience effectuée au Dahomey avec *G. palpalis*, une mouche examinée le 2 mars, soit le cinquante-quatrième jour après son repas infectant, ne présentait plus que quelques petits amas de formes trypanosomiennes à l'extrémité distale de l'hypopharynx. Toute l'infection

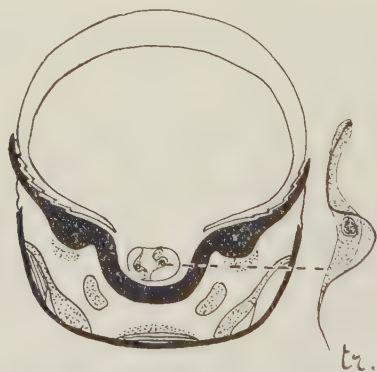


FIG. 2. — Infection réduite à l'hypopharynx (*Tr. cazalboui*). Les trypanosomes salivaires, *tr.*, peuvent être parfois remplacés par des formes crithidiennes.

du canal labial avait disparu. Les trypanosomes subsistants formaient de petits amas libres d'agglutination, sans aucune adhérence aux parois de l'organe selon le mode habituel. Il s'agissait manifestement d'une infection en cours d'extinction spontanée.

OBSERVATION 2. — Dans une expérience effectuée le 9 mars avec *G. palpalis*, au Dahomey, une mouche examinée le 25 mars, seize jours après le repas infectant, montre quelques trypanosomes encore vivants et un certain nombre de formes d'altération dans l'intérieur de l'hypopharynx. Aucune forme crithidienne vivante n'est visible sur les parois du labre, mais seulement quelques amas résiduels de flagellés en état d'involution.

Dans la même expérience, une mouche morte tout fraîchement le 1^{er} mai, cinquante-trois jours après le repas infectant, montre des trypanosomes inertes uniquement localisés dans le

liquide hypopharyngien; aucune forme n'est visible dans le canal labial.

Dans la même expérience, enfin, une dernière mouche morte le 1^{er} juillet, soit *cent onze jours après le repas infectant initial*, a montré exclusivement de petites formes crithidiennes établies dans le canal labial; aucune forme trypanosomienne n'était visible dans l'hypopharynx. Cependant, cette mouche avait piqué la veille un cabri qui s'est infecté et a présenté des trypanosomes le 11 juillet. On peut donc penser, d'après les conditions de l'infection observée vingt-quatre heures plus tard, que, au cours de son dernier repas, la mouche s'était totalement déchargée de ses formes métacycliques infectantes.

Si par le vieillissement, dans les conditions les plus favorables de la captivité, les mouches voient ainsi leur infection se modifier dans sa forme et tendre à disparaître, on peut expérimentalement, en imposant aux Glossines des conditions hygrométriques nettement défavorables, provoquer des phénomènes analogues de désinfection partielle ou d'évolution anormale, comme l'indiquent les expériences exposées ci-après.

a) INFLUENCE DE L'HUMIDITÉ CONTINUE.

EXPÉRIENCE 1. — 12 *Gl. palpalis* prennent des repas infectants massifs sur cabri infecté de *Tr. cazalboui* les 11, 12, 13 et 14 avril. Ces mouches sont placées à 23-28°C en chambre humide close, et soumises à des conditions d'atmosphère saturée continue, sans renouvellement de l'air. A partir du 18 avril, 8 mouches subsistent qui piquent tous les jours un cabri neuf, n° 32. L'examen des Glossines est fait à partir du neuvième jour : une seule mouche est reconnue infectée. L'infection est faible, *purement crithidienne*, l'hypopharynx est vierge de formes infectantes.

Le cabri 32 ne s'infecte pas.

Or, des mouches témoins, soumises aux mêmes conditions d'infection, mais à l'air libre, avec 70 p. 100 environ d'état hygrométrique, se sont infectées dans une proportion de 8 sur 12, et dès le sixième jour, parfois mêmes dès le deuxième jour, des trypanosomes métacycliques ont pu être observés dans le canal de l'hypopharynx.

b) INFLUENCE DE L'AIR SEC.

EXPÉRIENCE 1. — 12 *Gl. palpalis* sont placées, avant tout repas infectant, dans un récipient de verre clos dont l'air est en partie desséché par quelques

pastilles de potasse. La moyenne thermique varie de 23 à 35°C. Repas sur cabri-virus les 11, 12, 13 et 14 avril. Du 18 au 20, les mouches qui sont conservées en air sec piquent un cabri neuf qui ne s'infecte pas. L'examen des glossines est fait à partir du neuvième jour. Aucune infection n'est constatée.

EXPÉRIENCE 2. — 8 mouches sont nourries les 2 et 3 mai sur cabri-virus et, seulement après repas infectant, placées en air sec en présence seulement d'une pastille de potasse. Elle piquent ensuite un cabri neuf qui ne s'infecte pas. Examen le neuvième jour: 4 sur 8 d'entre elles présentent une infection légère, avec formes crithidiennes dans la cavité labiale et trypanosomes métacycliques dans l'hypopharynx. Le cabri piqué ne s'infecte pas.

EXPÉRIENCE 3. — 15 mouches, après avoir pris deux jours de suite un repas infectant sur cabri, sont placées en air desséché par des pastilles de potasse le 13 mai. Elles piquent à partir du quinzième jour un cabri neuf qui s'infecte le 9 juin d'infection mortelle.

L'examen des mouches pratiqué du 3 au 27 juin donne 3 résultats d'infection sur 15. Les infections sont du type normal.

Des expériences témoins réalisées avec des mouches placées dans des conditions d'humidité normale (environ 70 p. 100 d'état hygrométrique) ont donné, dans les mêmes conditions de repas infectant, respectivement 8 sur 9 et 8 sur 12 Glossines infectées.

Dans les expériences suivantes, on a fait agir l'action de l'air sec pendant un temps plus considérable avant que les mouches n'aient été mises à même de s'infecter, et le dessèchement a été progressivement beaucoup plus poussé que dans les expériences précédentes, en utilisant finalement un nombre élevé de pastilles de potasse desséchantes pour le même récipient (1).

EXPÉRIENCE 4. — 10 *Gl. palpalis* nées au laboratoire sont placées en air sec, à 3 pastilles de potasse à partir du 4 juillet. Les 7 et 8, repas infectant sur cabri-virus, puis les conditions de dessèchement relatif de leur milieu sont rendues plus accentuées en doublant le nombre des pastilles de potasse.

Les mouches piquent les 18 et 19 juillet un cabri neuf n° 26, et les 27 et 28 un cabri neuf n° 27. Les deux animaux piqués s'infectent, mais font une maladie bénigne à laquelle ils survivent.

(1) Les expériences ayant été poursuivies en saison humide, il a été nécessaire d'utiliser des moyens de dessèchement plus grands que dans les expériences précédentes. L'état de fortune de notre installation expérimentale d'alors ne permettait pas le dosage précis de l'état hygrométrique dans le box d'expérimentation.

L'examen des glossines ne révèle qu'une seule infection sur 10 mouches. Cette infection est du type représenté dans la figure 2. Elle comporte exclusivement quelques formes trypanosomiennes dans l'*hypopharynx*, sans aucune crithidie visible dans le reste de la trompe.

EXPÉRIENCE 5. — 6 *Gl. palpalis* nées de pupes placées en air desséché par la potasse depuis leur formation sont nourries les 7, 8, 9 juillet sur cabri-virus, puis placées en air sec en présence de 6, puis 7 pastilles de potasse. Elles piquent les 18 et 19 le cabri neuf n° 25, les 27 et 28 le cabri neuf n° 28. Les deux animaux s'infectent et font tous deux une infection exceptionnellement sévère; mort le huitième jour après apparition des trypanosomes pour l'un, le quatrième jour pour l'autre.

Les mouches examinées le 29 montrent 2 infections sur 6, du type normal, flagellés au labre et à l'hypopharynx.

Cette dernière expérience a paru faire ressortir que les Glossines accoutumées à l'air sec pendant un temps prolongé au cours de leur période nymphale réagissent moins à l'influence stérilisante de l'air sec que les mouches soumises depuis peu de temps à cette influence.

Il faut retenir de ces données, d'une façon générale, que les modifications extérieures du milieu retentissent sur les conditions physiologiques du milieu salivaire de manière à influencer de façon certaine l'évolution cyclique et la virulence des trypanosomes.

Sous l'influence des conditions du milieu, en particulier de l'air sec, nous voyons le type de l'infection et son siège se modifier parfois dans la trompe des mouches : ou bien les trypanosomes métacycliques n'apparaissent pas, ou ils n'apparaissent que plus tardivement qu'à la normale, ou bien les crithidies disparaissent et l'infection se localise, sans doute pendant peu de temps, dans l'hypopharynx, présageant l'extinction prochaine de l'infection (1).

La désinfection des trompes sous l'influence de conditions extérieures défavorables, nous est également apparue au cours de nos expériences effectuées avec G. Bouet (1911), sur *Gl. morsitans* dans la région nord du Dahomey et au Soudan nigérien, en saison sèche. Aussitôt après la capture, avant l'entrée

(1) BOUFFARD, 1910, a également noté des infections limitées à l'hypopharynx dans ses expériences du Soudan, avec *Gl. palpalis*.

en expérience, les *Gl. morsitans* de la région dite du W nigérien, montraient une proportion de 4/10 d'infections spontanées du type *cazalboui*. Après un temps de conservation en captivité allant du vingtième au trente et unième jour, les mouches restantes, nourries tous les jours sur des moutons, ne montrèrent plus que deux infections sur 13 mouches. Une de ces infections, chez une Glossine sacrifiée le vingtième jour, était une infection exclusive de l'hypopharynx, du type de la figure 2.

Il ne fait pas pour moi de doute que les actions, surtout hygrométriques extérieures, ne contribuent à influencer l'état d'infection des mouches. J'ai indiqué déjà antérieurement (1910) que dans les expériences réalisées au Dahomey en saison sèche avec des espèces hygrophiles, à une moyenne hygrométrique de 70 p. 100, la proportion des trompes infectées, pour un seul repas infectant, s'est élevée à 66 p. 100, tandis qu'en saison pluvieuse (moyenne hygrométrique = 80 p. 100) elle n'était plus que de 12 p. 100, se rapprochant de la proportion observée à Brazzaville, dans mes premières expériences de 1908, sur différents virus.

L'expérience réalisée dans la même région du W nigérien, avec 150 Glossines *tachinoïdes* (Bouet et Roubaud, 1910), plaide également dans le même sens. Du 26 février au 23 mars, 150 *tachinoïdes* prises dans la nature ont piqué successivement les animaux suivants :

Du 26 au 28 février.	Cobaye.
Du 1 ^{er} au 3 mars.	Chien.
Du 4 au 9 mars.	Mouton neuf D.
Du 10 au 14 mars.	Chien.
Du 15 au 17 mars.	Mouton neuf F.
Du 18 au 24 mars.	Chien.

Des deux animaux sensibles au *Tr. cazalboui*, seul le premier mouton (D) s'infecte après une incubation de très longue durée (vingt-trois jours). Le deuxième mouton (F) fut piqué par une cinquantaine de Glossines et ne s'est pas infecté.

18 des mouches restantes ont été nourries les 25 et 26 mars, sur un âne porteur de *Tr. cazalboui*. Du 27 mars au 2 avril, ces mouches, mises à piquer sur un cabri neuf, ne l'ont pas infecté.

Ces résultats contrastent nettement avec les résultats obtenus

avec la même espèce de mouches en période humide dans le Dahomey moyen où, à partir du sixième jour, 20 mouches, infectées expérimentalement, ont transmis une infection mortelle à tous les animaux piqués. (Bouet et Roubaud, *Ces Annales*, 1910, p. 665.)

J'ai conclu de tous ces faits, et d'autres qui furent publiés en leur temps, que les conditions physiologiques auxquelles sont soumises les Glossines, sont susceptibles d'influer sur leur infection salivaire. La démonstration en est plus facile à faire pour les virus du groupe *cazalboui-vivax*, dont le type évolutif cyclique est limité à la trompe, que pour les autres types de virus dont l'infection salivaire est, en principe, entretenue par une forte infection intestinale, continue jusqu'à la trompe.

Le siège ou la forme de l'infection proboscidiennne peuvent être influencés par les plus ou moins bonnes conditions de vie des mouches. Tantôt, nous voyons l'apparition des flagellés métacycliques dans l'hypopharynx suspendue ou retardée, tantôt, au contraire, c'est l'infection crithidienne labiale qui s'éteint complètement et le virus n'est plus décelable que dans le minime canal de l'hypopharynx. Ce type d'infection nous paraît, sans conteste, correspondre à un processus d'épuisement de l'aptitude infectante.

Aux modifications de l'infection dans son siège et dans sa forme, paraissent s'ajouter également des modifications dans la virulence du virus transmis. Ce sont ces faits sur lesquels nous sommes appuyé pour mettre en évidence les relations biogéographiques des Glossines et des virus trypanosomiens divers (Roubaud, 1913 a). Les facteurs climatiques ou microclimatiques agissant sur les mouches influent, par contre-coup, sur les possibilités d'évolution cycliques des virus.

ACTION DE LA CHALEUR SUR L'ÉVOLUTION CYCLIQUE DE *Tr. cazalboui*.

Dans ces influences climatiques ou microclimatiques susceptibles de modifier la marche de l'infection chez les Glossines, de la favoriser ou de la faire disparaître, ce sont surtout, selon moi, les facteurs d'ordre hygrométrique qui se montrent capables d'exercer l'action la plus grande. Cela est dû à la

sensibilité particulière des Glossines en général à l'air sec. Mais il est évident que les espèces hygrophiles, comme *Gl. palpalis*, *Gl. tachinoïdes*, *Gl. longipalpis*, seront sans doute plus affectées encore par le dessèchement de l'air que les espèces plus xérophiles comme *morsitans*.

L'influence exercée par une haute température sur l'évolution cyclique des virus humains chez les tsétsés, a fait l'objet d'une discussion récente de H. L. Duke (1933), à la suite des expériences de A. W. Taylor sur *Gl. tachinoïdes*. Cet auteur a montré qu'une température élevée favorise l'infection de la mouche. Comme l'a fait observer Duke, l'action de températures anormales peut avoir pour influence de diminuer la résistance normale des Glossines à l'infection.

Chez *Gl. palpalis*, au Dahomey, j'avais effectué, en 1910, une expérience conçue dans le même ordre d'idées, en utilisant comme virus *Tr. cazalboui*, plus facile à transmettre aux Glossines. Cette expérience, qui n'a pas été publiée en son temps parce qu'elle avait donné des résultats négatifs, fut la suivante :

Trois lots de 15 *Gl. palpalis* chacun, furent placés :

Premier lot à 35-38°C., une heure avant le repas infectant, puis, aussitôt après, reporté à 35-38°C. pendant trois heures. Après ce temps, le lot fut reporté à la température ordinaire 22-23°C.

Deuxième lot à 35-38°C., une heure avant le repas infectant, puis, aussitôt après, reporté à la même température pendant six heures. Après ce délai, le lot est reporté à 22-23°C.

Troisième lot, témoin, à 22-23°C.

Le repas infectant fut fourni par un même animal (cabri) fortement infecté. La dissection des mouches de chacun des lots fut effectuée neuf jours plus tard. Elle a donné les résultats suivants :

Lot n° 1 : 2 infections faibles sur 14 mouches. L'une des deux infections est encore limitée à la période de multiplication crithidienne. Les trypanosomes métacycliques ne sont pas apparus dans l'hypopharynx.

Lot n° 2 : 1 infection intense et complète sur 14 mouches.

Lot-témoin : 3 infections, dont une forte, les deux autres légères mais normales, sur 14 mouches.

Cette expérience ne permet pas de penser que la haute température exerçant son action pendant la période initiale du développement salivaire, ait exercé une action favorisante sur le développement. Il semble, au contraire, que la haute température ait exercé une action plutôt défavorable sur l'aptitude du virus à évoluer chez les mouches.

INFLUENCE DE LA NATURE DU SANG INGÉRÉ SUR L'INFECTION.

Certains auteurs, en particulier H. L. Duke (1921), ont développé la thèse que la nature du sang ingéré par les Glossines influe sur leur aptitude à s'infecter par les virus polymorphes, notamment par les virus de souche humaine. Les mouches nourries, après repas infectant initial, au sang de reptiles renferment une proportion moindre d'individus infectés que celles qui ont été constamment nourries sur des singes.

J'ai effectué au Dahomey, en 1910, des recherches de même nature en partant de *Tr. cazalboui*. Les expériences qui furent les suivantes n'ont pas permis de constater une influence quelconque de la nature du sang ingéré sur l'infection salivaire des mouches par le virus monomorphe.

A. — 15 *Gl. palpalis* furent nourries du 15 au 25 novembre sur une poule. Du 25 au 26, elles prirent un repas infectant sur une chèvre infectée de *Tr. cazalboui*, puis furent soumises ensuite à l'alimentation exclusive au sang de poule. 10 des mouches restantes furent sacrifiées et examinées huit jours après le repas infectant. 2/10 infections normales de la trompe furent constatées.

B. — 12 *Gl. palpalis* furent nourries sur animaux à sang froid (varans, tortues) du 15 au 25 octobre. Les 25 et 26, elles prirent un repas infectant sur chèvre infectée de *Tr. cazalboui*, puis furent soumises à l'alimentation exclusive sur varans et tortues. Le septième jour après le repas infectant les 8 mouches restantes furent sacrifiées : 2/8 infections normales de la trompe furent constatées.

Les chiffres d'infections relevés dans ces deux essais sont très semblables au chiffre qui fut habituellement obtenu en nourrissant les Glossines au sang des mammifères. On ne peut en conclure que l'alimentation au sang d'oiseau ou de reptile exerce une influence défavorable sur l'aptitude des Glossines à prendre l'infection salivaire immédiate qui caractérise les virus du groupe *cazalboui-vivax*.

L'INFECTION HYPOPHARYNGIENNE STRICTE, INFECTION TÉLÉOCYCLIQUE.

Si l'on se rapporte à ce que nous avons dit plus haut, on voit que l'infection à *Tr. cazalboui* se localise parfois chez les Glossines à la cavité hypopharyngienne, sans que le développement crithidien au labre soit apparent. G. Bouffard (1910)

avait également, au cours de ses mémorables recherches sur l'évolution et la transmission de *Tr. cazalboui*, signalé de telles infections parfois restreintes à l'hypopharynx chez ses Glossines. D'après les faits que nous avons exposés, il semble bien que ce type d'infection représente une période ultime du processus évolutif salivaire, annonçant que la trompe de l'insecte est en cours de stérilisation. J'ai d'ailleurs constaté une fois chez une *Gl. longipalpis* dont l'hypopharynx paraissait la seule partie de la trompe encore envahie par les flagellés, un petit reliquat de formes crithidiennes à l'entrée du pharynx. L'infection, pour la plus grande part limitée à l'hypopharynx, représentait donc bien le processus terminal ou téléocyclique d'une infection en voie d'extinction. Il ne semble pas en effet que les trypanosomes logés dans le milieu salivaire du tube hypopharyngien soient aptes à reproduire ultérieurement l'infection crithidienne du labre. Il ne semble pas non plus, du moins le fait n'a jamais été constaté, que les infections limitées au canal de l'hypopharynx procèdent d'une multiplication ou d'une évolution sur place de trypanosomes du vertébré ayant pénétré directement dans cet organe au cours du repas infectant. Il n'a presque jamais été constaté de multiplication apparente des trypanosomes dans l'hypopharynx. Ces organismes n'y sont pas à l'état de reproduction, mais de repos et d'attente et l'on ne concevrait pas bien qu'ils puissent à eux seuls entretenir l'infection hypopharyngienne des mouches, lorsque les éléments crithidiens multiplicateurs font défaut dans le canal labial.

L'observation citée plus haut montre d'ailleurs qu'à la suite d'un repas de sang les mouches dont l'infection labiale est affaiblie peuvent décharger plus ou moins complètement leur hypopharynx des formes infectantes qu'il renfermait. Cet organe n'entretient donc pas par lui-même son infection.

II. — *Trypanosoma dimorphon-congolense*.

L'évolution cyclique normale de *Tr. dimorphon* procède, comme on le sait, et comme il a été établi pour la première fois par nos recherches avec G. Bouet, d'une multiplication initiale

dans le tube digestif avec ascension progressive vers l'œsophage, puis vers la trompe des formes trypanosomiennes de multiplication initiale (fig. 3, I). L'envahissement ultérieur de la trompe s'accompagne d'une transformation crithidienne dans

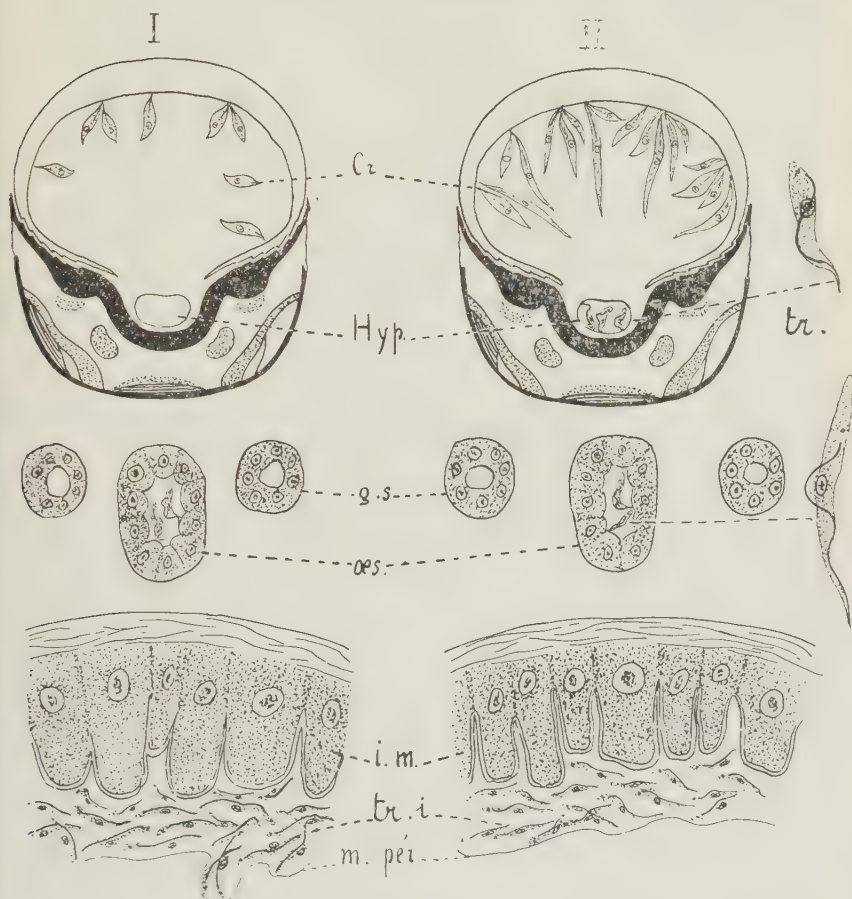


FIG. 3. — Schéma de l'évolution normale des virus du type *Tr. dimorphoncongolense*, de l'intestin à la trompe. Les organes vus en coupes transversales.

I. Début de l'envahissement du canal labial par les formes crithidiennes, *Cr.*, après ascension vers la trompe des grands trypanosomes intestinaux, *tr. i.*, qui ont gagné l'œsophage *æs.*

II. Stade plus avancé. Les trypanosomes métacycliques *tr.* ont envahi l'hypopharynx *Hyp.*

i. m., portion de la paroi d'une anse de l'intestin moyen; *tr. i.*, infection intestinale correspondante; *m. pér.*, membrane péritrophique; *æs.*, *g. s.*, section de l'œsophage et des glandes salivaires.

le liquide labial où les colonies se multiplient et s'allongent comme dans le cas précédent. Déjà, au bout du dixième jour, j'ai vu les longs trypanosomes d'origine intestinale se fixer aux parois du labre. Ultérieurement, on voit apparaître les petits trypanosomes métacycliques facilement reconnaissables à leur apparence aflagellée classique, dans le liquide de l'hypopharynx (fig. 3, II, *tr.*).

Les formes que j'ai jadis étudiées et décrites (1908) en les rapportant à *Tr. congolense* dans les infections totales naturelles des Glossines du Congo sont identiques à celles qui ont été observées et figurées par moi (1913 *b*) dans les infections rapportées à *Tr. dimorphon* de l'Ouest africain. Les observations des auteurs belges au Katanga lui sont superposables ainsi que celles de Duke (1912) pour *Tr. nanum*, de Fraser et Duke, Miss Robertson pour *Tr. pecorum*, de Bruce (1914) pour *Tr. simiæ*, etc.

Ce type de développement dont la figure 3 (I et II) schématise les deux principaux stades de l'évolution définitive, est-il le seul qui puisse se réaliser?

J'ai noté dans un cas, chez une *Gl. longipalpis* du Dahomey, une infection naturelle exclusivement réduite à la trompe, sans aucune trace d'infection intestinale, antérieure ou postérieure. L'infection labiale était très intense ainsi que l'infection hypopharyngienne dont les trypanosomes salivaires caractéristiques purent être identifiés facilement au type *dimorphon*. L'inoculation de la trompe à un cobaye ne fut malheureusement pas suivie d'infection, mais la coloration des flagellés permit de distinguer à coup sûr cette infection strictement limitée à la trompe (comme le représente la fig. 4), des infections semblables produites par les trypanosomes du groupe *vivax-cazalboui*.

Que faut-il penser de ce type d'infection? S'agit-il d'une régression secondaire de l'infection intestinale non suivie de régression de l'infection salivaire, ou bien d'une évolution immédiate sur place du virus dans le milieu salivaire, suivant le mode observé pour le groupe *cazalboui-vivax*?

La désinfection progressive du tube digestif est admise par L. Lloyd et W. Johnson (1923-1924) pour les infections immatures du type *congolense*, c'est-à-dire pour des infections du

tube digestif, mais non pour des infections salivaires. Il semble que ces infections une fois établies dans la trompe se maintiennent pendant toute la vie de la mouche.

L'infection digestive peut effectivement disparaître en laissant l'infection salivaire intacte, comme je l'ai montré, lorsque les Glossines sont nourries sur des animaux traités par des arsenicaux (atoxyl). L. H. Duke (1913) a vu le même fait pour les virus *brucei-gambiense*. Mais, dans les conditions naturelles, nous n'avons pas beaucoup d'exemples certains établissant que les infections du virus à multiplication initiale dans le tube

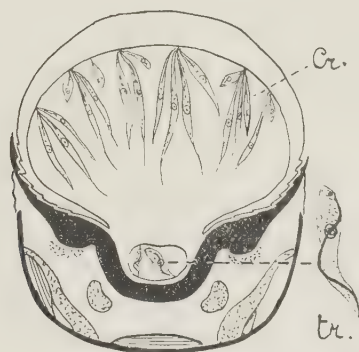


FIG. 4. — Cas d'infection réduite à la trompe pour un virus du type *dimorphon* des Glossines *longipalpis*, au Dahomey. *Cr.*, touffes crithidiennes fixées au labre; *tr.*, trypanosomes de l'hypopharynx.

digestif puissent régresser spontanément. En faveur de cette théorie, je citerai seulement, d'après mon expérience personnelle, l'observation suivante : J'ai observé chez une *Gl. longipalpis* présentant une infection naturelle par *Tr. dimorphon*, au Dahomey, après une conservation de trente-cinq jours en captivité, une infection intense et complète de la trompe, alors que les parties antérieures du tube digestif : pharynx, proventricule et intestin antérieur étaient complètement vierges de tout flagellé. Tout à fait à l'extrémité terminale de l'intestin moyen, la mouche présentait seulement un reste de culture trypanosomienne. Aucune continuité n'existait plus chez cette mouche entre les formes de multiplication intestinale et celles du milieu salivaire : le milieu salivaire de la trompe ne renfermait pas les grands trypanosomes émanés du proventricule

que l'on rencontre habituellement dans les infections totales dues à ce type de virus.

On peut donc bien penser ici que le tube digestif de l'insecte était le siège d'une désinfection trypanosomienne très avancée, ce processus spontané de stérilisation ayant cependant laissé intacte l'infection salivaire. Il est beaucoup plus fréquent de constater des apparences inverses.

Dans une autre observation portant par exemple sur une *Gl. tachinoides* ayant pris un repas sur bœuf à *dimorphon*, quarante-sept jours auparavant, j'ai pu constater une infection faible du tractus digestif seul, s'arrêtant juste à la région pharyngienne, sans avoir réussi à ensemencer l'infection salivaire de la trompe. Comme des infections totales intenses du tube digestif ont pu être observées par moi, déjà de cinq à sept jours après le repas infectant, chez les mouches vierges soumises aux infections par *Tr. dimorphon*, on est en droit de penser qu'une infection, demeurée restreinte au tube digestif, comme dans la mouche précédente, après quarante-sept jours, représentait peut-être le fait d'une régression spontanée de l'infection pour les parties antérieures. Mais il est également possible que certaines mouches conservent toute leur vie une infection réduite au tube digestif seul, sans jamais présenter d'infection salivaire, ainsi qu'il a été observé pour les virus humains par différents auteurs. Miss Robertson a, par exemple, signalé de rares cas où les mouches infectées de *Tr. gambiense* peuvent présenter des flagellés encore localisés au tube digestif, au cinquante-sixième jour, sans que l'infection ait atteint le milieu salivaire. Il y a certainement des cas — et les auteurs belges Van Hoof et Henrard y sont revenus dernièrement (1934) — où les Glossines prennent une infection intestinale typique pour des virus comme *dimorphon*, *congolense*, *brucei*, *gambiense*, etc., susceptibles de se multiplier dans l'intestin, sans que jamais cette infection parvienne à s'étendre au milieu salivaire pendant le cours de la vie de la mouche. Mais une désinfection progressive et totale du tube digestif, laissant intacte l'infection salivaire, est plus difficile à comprendre, au moins pour des mouches placées dans des conditions d'alimentation normales.

En ce qui concerne les virus humains, un certain nombre d'observations existent, relatives à des cas d'infection exclusi-

vement salivaire, sans infection intestinale, comparables en somme à celle que je signale ici pour *Tr. dimorphon*. Par exemple, Duke (1933) relate l'observation d'une Glossine dont les glandes salivaires étaient infectées de *Tr. gambiense* sans qu'aucun parasite fut présent dans le tractus intestinal. Déjà Bruce (1910) avait noté que 12 *Gl. palpalis*, reconnues négatives à l'examen du tube digestif avaient, après broyage et inoculation, infecté des singes. Les auteurs belges L. Van Hoof et C. Henrard (1934) relatent également des cas d'infection purement salivaire chez des Glossines infectées au *gambiense*. Dans tous ces exemples, comme dans le nôtre, il est permis de penser que l'infection salivaire exclusive, lorsqu'elle est constatée par des virus susceptibles d'évolution intestinale, procède d'une stérilisation préalable de l'infection digestive. Mais ce fait, considéré par Duke (1921) comme improbable, n'est pas formellement démontré. Dans le cas tout au moins des virus du type *congolense-dimorphon*, rien ne s'oppose à l'hypothèse que dans certains cas, suivant le mode que j'ai formulé, en 1909, l'infection salivaire puisse s'établir d'emblée, d'une façon directe sans être précédée d'une multiplication trypanosomienne dans le tube digestif.

De même que certaines mouches se montrent susceptibles d'une infection intestinale durable et typique, sans que jamais cette infection parvienne au milieu salivaire, de même il est permis de penser que certaines mouches peuvent prendre d'emblée une infection salivaire durable et typique sans que les conditions de leur milieu intestinal y permettent l'établissement d'une infection.

Dans ces cas d'exception pour lesquels l'infection s'est établie exclusivement dans le milieu salivaire, la possibilité d'une extinction ultérieure et complète de l'infection serait plus facile à comprendre que lorsqu'il s'agit de mouches complètement infectées, de l'intestin au milieu salivaire. Bruce (1914) relate l'observation d'une mouche (*Gl. morsitans*) qui, conservée en tube pendant treize jours après avoir infecté un lapin et un rat, n'avait plus décelé aucun flagellé dans son organisme, et il admet à ce sujet que les Glossines peuvent parfois perdre leur infection. Ce serait là, pour Duke (1933), un phénomène très rare. Nous avons vu cependant que pour les virus à évolution

salivaire directe, type *cazalboui*, la désinfection salivaire est parfois constatée. Rien ne permet de penser qu'il n'en soit pas ainsi pour les autres types d'infection, et plus particulièrement lorsque l'infection s'est trouvée, secondairement ou de prime abord, localisée au milieu salivaire strict.

III. — *Trypanosoma pecaudi*.

Nous avons fait connaître, avec Bouet, que l'évolution cyclique de ce virus est comparable à celle des *Tr. dimorphon-congolense*. Des doutes ont été émis par H. L. Duke (1921) relativement au siège de cette infection dans la cavité labiale et l'hypopharynx des glossines. Si le *Tr. pecaudi* est assimilable aux virus dimorphes du type *brucei* comme on tend à le concevoir actuellement, il est, en effet, curieux de constater que ce virus échappe au processus d'invasion des glandes salivaires qui caractérise l'évolution des virus du groupe *brucei-gambiense-rhodesiense*.

Pourtant, L. L. Lloyd et W. B. Johnson (1924) ont fait observer avec juste raison que l'on avait trop insisté, dans ce groupe de virus polymorphes, sur l'absence de flagellés dans la trompe. La Commission de la Vallée de la Luangwa cite une *Glossina morsitans* dont la trompe était fortement infectée de *Tr. rhodesiense*, en même temps que les glandes salivaires. Lloyd et Johnson, dans 7 cas d'infection constatés chez *Gl. tachinoïdes*, 2 cas pour *Tr. gambiense*, 5 cas pour *Tr. brucei*, ont observé des trypanosomes du type proventriculaire dans la trompe. Chez 2 mouches prises dans la nature et infectées expérimentalement avec *Tr. brucei*, des trypanosomes du type proventriculaire étaient présents dans la trompe. Chez une des mouches, les glandes salivaires étaient infectées, chez l'autre, pas (*loc. cit.*, p. 287).

Dans deux autres mouches, le proventricule et la trompe furent reconnus infectés, mais les glandes salivaires ne montrèrent qu'une infection faible sans flagellés mobiles (*loc. cit.*, p. 288).

Au cours de nos recherches avec G. Bouet, l'infection de la trompe des Glossines infectées avec *Tr. pecaudi* a été décelée

dans 4 cas sur 4, pour lesquels il y eut confirmation par l'inoculation expérimentale. Dans 2 cas, des trypanosomes du type proventriculaire et des *Crithidia* étaient fixés au labre ou présents dans la cavité labiale, en même temps que des trypanosomes métacycliques dans l'hypopharynx.

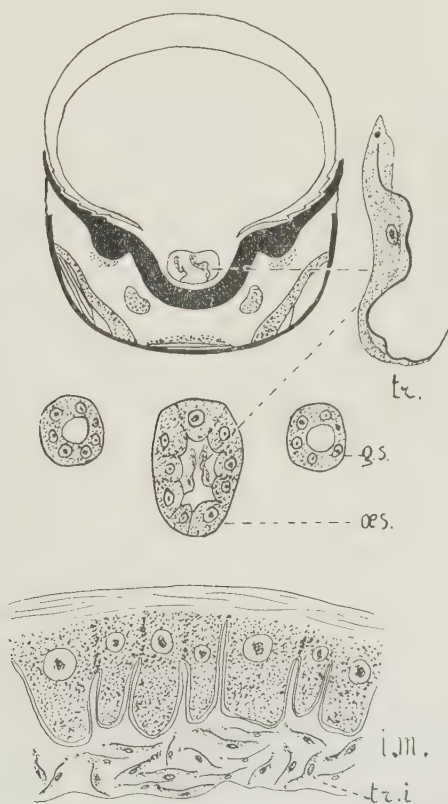


FIG. 3. — Type d'infection constatée à deux reprises pour *Tr. pecaui*, dans laquelle le tube digestif était envahi jusqu'aux parties antérieures, mais l'infection de la trompe strictement réduite à la lumière de l'hypopharynx. (Même notation que pour la figure 3.)

Dans les deux autres cas, l'infection du labre ne fut pas constatée. On avait affaire à un processus dont les traits généraux sont exprimés dans le schéma de la figure 5, c'est-à-dire infection totale continue du tube digestif, à la manière ordinaire, jusqu'à l'entrée du pharynx et, pour la trompe, infection

intense mais limitée exclusivement au canal intérieur de l'hypopharynx. Ce type d'infection, si l'on exclut le développement dans les différentes parties du tube digestif, est comparable à celui représenté dans la figure 2 pour *Tr. cazalboui*. Je pense, et c'est ainsi que nous l'avons interprété (Bouet et Roubaud, 1910, p. 601) qu'encore ici il s'agissait d'une infection vieillie, dans laquelle les formes de la cavité labiale ont disparu les premières.

Dans l'hypopharynx, les formes rencontrées sont des trypanosomes semblables à ceux du sang, mais du type long. Dans un des deux cas observés d'infection de la trompe réduite à cet organe, quelques formes crithidiennes courtes furent décelées en très petit nombre, fixées au voisinage de l'orifice libre de l'hypopharynx. L'envahissement profond des glandes salivaires n'a pas été vu, mais il serait possible, quoique peu vraisemblable, que les glandes se fussent secondairement désinfectées. Je pense, bien que je ne l'ai pas constatée, que pour ce virus l'infection des glandes doit être réalisable mais, dans mon esprit, cette infection salivaire profonde ne représente qu'un phénomène secondaire. Le fait essentiel est que les flagellés puissent être présents dans la trompe et capables de provoquer des infections. Or, dans chaque cas de nos observations, l'état d'infection des Glossines fut décelé par l'examen de la trompe et dans deux essais sur deux l'inoculation de trompes présentant une infection complète à la fois du labre et de l'hypopharynx a transmis *Tr. pecaudi* aux animaux.

Il convient, d'autre part, de faire remarquer que dans les infections à *Tr. pecaudi* telles que nous les avons observées chez les Glossines, l'infection salivaire proprement dite n'a pas été reconnue indispensable pour la reprise de la virulence des flagellés. Dans le liquide du pharynx, à l'entrée de la trompe, nous avons constaté l'existence de formes trypanosomiennes mobiles et actives, à peu près semblables à celles de l'hypopharynx, et l'inoculation de ces parasites à des cobayes a été suivie d'infection, dans une expérience sur deux réalisées. On peut donc penser que l'infection peut parfois se réaliser par simple régurgitation de ces formes pharyngiennes au moment de la piqure.

Duke (1933) a fait observer que Bruce et ses collaborateurs dans l'Ouganda n'ont pas confirmé l'observation faite par Yorke

et ses collègues en Rhodésie suivant lesquelles des formes infectantes pour les mammifères sont présentes dans l'intestin des mouches. Il considère ces formes infectantes intestinales comme des formes des glandes salivaires ramenées dans l'intestin des mouches par déglutition. En ce qui concerne *Tr. pecaudi*, nous avons montré avec Bouet (II, 1940, p. 603) que, non seulement les formes du pharynx peuvent, par inoculation expérimentale, reproduire l'infection chez le vertébré, mais aussi celles de l'intestin moyen (un essai positif sur deux). Dans ce dernier cas, la virulence des formes intestinales n'a été constatée que chez une mouche tout fraîchement gorgée de sang et nous avons pensé que les formes infectantes provenaient d'une déglutition, au moment de la piquûre, des formes de la trompe et du pharynx. Mais pour ce qui concerne les trypanosomes infectants du pharynx, qui ne sont point tout à fait semblables aux trypanosomes du sang ni à ceux de la trompe, on ne saurait penser, en raison de leur grande abondance, à des formes entraînées du milieu salivaire. Il paraît plus rationnel d'estimer que, pour le virus en question, l'infectiosité pour le vertébré commence à s'établir dès les parties tout à fait antérieures du tube digestif, dans le liquide d'origine salivaire qui remplit le pharynx. Les trypanosomes qui se multiplient dans ce milieu peuvent, sans avoir gagné la cavité labiale et l'hypopharynx, acquérir les qualités de virulence des trypanosomes métacycliques. Sans doute des infections pourront-elles parfois se produire par simple régurgitation de ces formes pharyngiennes au moment du repas des mouches, sans que l'entrée en jeu des formes de l'hypopharynx soit nécessaire. Mais il est difficile d'en faire la preuve parce que le caractère infectant des flagellés du pharynx n'a été observé que chez des mouches dont la trompe était également infectée. En fait, c'est le milieu salivaire qui, dans ces cas encore, paraît représenter le conditionnement essentiel de l'infectiosité.

Conclusions.

Des détails qui précèdent, je conclurai que l'infection observée chez les Glossines ne cadre pas toujours rigoureuse-

ment avec les modalités classiques de l'évolution cyclique établie pour les différents virus. Il peut y avoir suppression de l'un ou l'autre des termes de cette évolution dans le tube digestif où les différentes parties de la trompe et les glandes salivaires. Ces modifications du mode normal peuvent le plus généralement nous apparaître comme une conséquence de la désinfection spontanée partielle des mouches. Cette autostérilisation spontanée est certainement possible. Elle est facile à constater pour les virus à évolution salivaire directe, du type *vivax-cazalboni*. Mais, d'autre part, rien ne démontre, pour les virus à évolution salivaire indirecte (*dimorphon-congolense-gambiense*, etc.), que, dans certaines circonstances, la phase initiale de multiplication intestinale ne puisse être sautée, et l'infection s'établir d'emblée dans le milieu salivaire de la trompe. On peut également penser, pour les virus polymorphes (*pecaudi-brucei*-, probablement aussi *gambiense-rhodesiense*), que l'infection profonde des glandes salivaires n'est pas toujours nécessaire et qu'elle peut, ou bien disparaître, ou bien ne pas se réaliser de manière active chez des mouches dont l'hypopharynx et la cavité labiale sont, par eux seuls, capables de conserver et d'entretenir l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

- BOUET (G.) et ROUBAUD (E.), I. Expériences diverses de transmission des trypanosomes par les Glossines. Ces *Annales*, 24, août 1910.
- BOUET (G.) et ROUBAUD, II. Expériences diverses de transmission des trypanosomes par les Glossines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 3, f. 9, novembre 1910, p. 599.
- BOUET (G.) et ROUBAUD, III. Expériences diverses de transmission des trypanosomes par les Glossines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 3, fasc., 10, décembre 1910, p. 722.
- BOUET (G.) et ROUBAUD (E.), IV. Expériences diverses de transmission des trypanosomes par les Glossines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 4, fasc., 8, octobre 1911, p. 539.
- BOUET (G.) et ROUBAUD (E.), V. Expériences diverses de transmission des trypanosomes par les Glossines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 5, fasc., 3, mars 1912, p. 204.
- BOUFFARD (G.). *Glossina palpalis* et *Trypanosoma Casalboni*, 10 novembre 1909 et Ces *Annales*, 24, avril 1910, p. 276.
- BRUCE (D.) et collaborateurs, The Development of Trypanosomes in Tsetse Flies. *Proceedings of Royal Society*, Ser. B., 82, 1910, p. 369.

- BRUCE (D.), The Development of Trypanosomes in Tsetse Flies. *Proceedings of Royal Society*, Ser. B, **82**, 1910, p. 375.
- BRUCE (D.), The Trypanosomes causing the Disease in Man in Nyassaland, Part. III. Development in *Glossina morsitans*. *Proceedings of Royal Society*, Ser. B., **87**, 1914, p. 521.
- BRUCE (D.), Infectivity of *Glossina morsitans* in Nyasaland during 1912 and 1913. *Proceedings of the Royal Society*, Ser. B., **88**, p. 43-48 et *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, 1915, n° 16, p. 15-21.
- BRUCE, The Development in *Glossina morsitans* of *Trypanosoma gambiense*, Tanganyika. *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, 1915, n° 16, p. 201-203.
- DUKE (H. L.), The Transmission of *Trypanosoma nanum* (Laveran). *Proceedings of the Royal Society*, Ser. B., **85**, 4-9, 1912, et *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, n° 12, 1912, p. 3.
- DUKE (H. L.), Further Observations on the Recovery of *Trypanosoma gambiense* from *Tragelaphus spekei* on the Islands of Lake Victoria. *Proceedings of Royal Society*, Ser. B, **85**, 1912, p. 483-486.
- DUKE (H. L.), Some Experiments with Arsenophenylglycin and *Trypanosoma gambiense* in *G. palpalis*. *Proceedings of Royal Society*, Ser. B., **86**, 1913, p. 49.
- DUKE (H. L.), Notes on *Trypanosoma gambiense* and *Glossina palpalis*. *Reports on the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, n° 13, 1913, p. 2, 13-21.
- DUKE (H. L.), On the Zoological Status of the Polymorphic Mammalian Trypanosomes of Africa and their Relation to Man. *Parasitology*, **13**, 1921, p. 352-397.
- DUKE (H. L.), *Trans. Royal Society*, août 1924, p. 142.
- DUKE (H. L.), Studies on the Factors that may influence the Transmission of the Polymorphic Trypanosomes by Tsetse. IV. On the spontaneous disappearance of Flagellates from an Infected Glossina. *Ann. Trop. Med. Par.*, **17**, 21 oct. 1933, p. 431-438.
- DUKE (H. L.), Studies on the Factors that may influence the Transmission of the Polymorphic Trypanosomes by Tsetse. VI. On the Duration of the Biological Cycle in Glossines. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **27**, 1933, p. 451.
- FRASER and DUKE, The Development of Trypanosomes in *Glossina palpalis*. *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society*, n° 12, 1912, p. 36-56.
- HOOF (Van) et HENBARD (C.), La transmission cyclique de races résistantes de *Trypanosoma gambiense* par *Glossina palpalis*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **13**, juin 1913 et **14**, 31 mars 1934, p. 109.
- KINGHORN (W.) YORKE et LLOYD (L.), Final Report of the Luangwa Sleeping Sickness Commission of the British South Africa Company. *Ann. Trop. Med.*, **7**, 1919.
- KLEINE (F. K.), Weitere Beobachtung über Tsetse-fliege und Trypanosomenstudien. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, **35**, 1909, p. 1956-1958.
- KLEINE (F. K.) et TAUTE, Ergänzungen zu unseren Trypanosomenstudien. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, **31**, 1911, p. 321-376.
- LLOYD (L. L.) et JOHNSON (W. B.), The *Trypanosoma* Infections of Tsetse Flies in Northern Nigeria and a new method of Estimation. *Bull. Ent. Res.*, **14**, n° 3, mars 1924, p. 265-284.
- LLOYD (L. L.), Some Factors Influencing the *Trypanosoma* Infection rate in Tsetse Flies. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, **23**, 1930, p. 633.

- ROBERTSON MURIEL, Notes on the Life History of *Trypanosoma gambiense* with a brief reference to the Cycles of *Trypanosoma nanum* and *Trypanosoma pecorum* in *Glossina palpalis*. *Reports of the Sleeping Sickness Commission of the Royal Society.*, 14, n° 13, 1913, 119-142.
- ROUBAUD (E.), *La Glossina palpalis* in *La maladie du sommeil au Congo français*. Paris, Masson, édit., 1909.
- ROUBAUD (E.), Influence des réactions physiologiques des Glossines sur le développement salivaire et la virulence des Trypanosomes pathogènes. *C. R. Ac. des Sc.*, 24 octobre 1910.
- ROUBAUD (E.), Précisions relatives aux phénomènes morphologiques du développement des Trypanosomes chez les Glossines. *C. R. Acad. des Sc.*, 12 décembre 1910.
- ROUBAUD (E.). a. Relations biogéographiques des Glossines et des trypanosomes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 6, 1913, p. 28.
- ROUBAUD (E.). b. Evolution comparée des trypanosomes pathogènes chez les glossines. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 6, 1913, p. 435-441.
- THYLOR (A. W.), The Development of West African strains of *Trypanosoma gambiense* in *Glossina tachinoïdes* under normal laboratory conditions and at raised temperatures. *Parasitology*, 24, 1932, p. 401.

UNE MÉTHODE EFFICACE DE VACCINATION CONTRE LA POLIOMYÉLITE ANTÉRIEURE AIGÜE

Par JOHN A. KOLMER,

Professeur de médecine à Temple University,
Directeur du *Research Institute of Cutaneous Medicine*,
Philadelphie (U. S. A.).

Puisque la poliomyélite antérieure aiguë est considérée comme une maladie à virus immunisante, que les récives sont très rares et que la majorité des virus semblent être capables d'immuniser, il était indiqué de poursuivre les recherches en vue d'obtenir une méthode sûre et efficace de vaccination de l'homme contre cette maladie.

Une autre raison urgente qui motivait ces recherches est la mortalité qui varie de 7,3 à 43 p. 100 dans les différentes épidémies. On observe, en outre, une proportion élevée (25 à 45 p. 100) de paralysies résiduelles.

Bien que le nombre des cas soit petit, sauf pendant les épidémies, il semble cependant que la poliomyélite augmente de fréquence dans le Monde entier.

Le seul anticorps connu jusqu'à présent ayant une relation définie avec la résistance et l'immunité dans la poliomyélite antérieure aiguë est celui qui apparaît dans le sérum, normalement ou pendant un accès de la maladie, et se montre capable de neutraliser le virus *in vitro*; cet anticorps est désigné sous le nom d'anticorps « antiviral ». La présence d'une certaine quantité de cet anticorps dans 0 c. c. 5 de sérum neutralisant au moins 10 doses minima de virus de passage du singe semble indiquer une résistance effective.

Il est probable cependant que la résistance à la poliomyélite existe dans l'organisme sans quantité démontrable de cet anticorps dans le sang. Cette résistance des tissus peut dépendre des cellules sensibles au virus et capables de produire rapidement l'anticorps en cas d'infection ou de vaccination, ou

relever de la « maturation immunity », ou bien encore de l'activité physiologique des tissus.

Quoique 83 p. 100 environ des enfants nouveau-nés aient de l'anticorps dans le sang, des essais effectués avec le sérum de 20 enfants au-dessous de quatre ans, comprenant 9 sujets de mes séries personnelles n'ont pas abouti à la neutralisation du virus dans à peu près 79,2 p. 100 des cas ; ces enfants étaient apparemment réceptifs. Parmi 159 enfants de cinq à quatorze ans, comprenant 20 sujets de mes séries personnelles, 45,5 p. 100 en moyenne n'avaient pas d'anticorps antiviral. Sur 128 sujets au-dessus de quinze ans, des adultes en majorité, les sérums, dans 24.7 p. 100 des cas, n'ont pas neutralisé le virus.

Dans ces conditions, il semble très probable qu'un grand pourcentage de sujets réceptifs se rencontre dans toutes les communautés, particulièrement chez les enfants au-dessous de dix ans, ce qui rend une méthode de vaccination efficace et sans danger extrêmement désirable, surtout pendant les épidémies. Ce besoin est d'autant plus grand qu'une immunité passive, obtenue par l'injection du sérum de sujet sain ou convalescent contenant l'anticorps antiviral, est de courte durée.

Cependant, si la présence de l'anticorps antiviral dans le sérums des sujets sains est due aux attaques sans manifestations cliniques (subclinical) ou inapparentes de la maladie, la facilité avec laquelle il est apparemment produit indique que le vaccin pourrait aussi l'engendrer facilement chez un grand nombre de sujets susceptibles. Je ne puis partager l'avis de ceux qui croient que les procédés de l'immunisation naturelle, quels qu'ils soient, sont insuffisants, puisqu'un tel nombre de personnes, spécialement les enfants, contractent la maladie avant qu'ils puissent développer cette immunité, et, s'ils ne meurent pas, guérissent tout en restant estropiés et invalides pour le reste de leur vie.

Puisque les vaccins d'autres virus préparés avec des tissus d'animaux, comme ceux de la vaccine (veaux), rage (lapins), fièvre jaune (souris), psittacose (souris), etc..., immunisent l'homme, il semble très probable que les vaccins extraits de la moelle épinière de singes poliomyélitiques vaccineront

l'Homme. Ainsi, l'anticorps produit par mon vaccin a neutralisé, chez un nombre d'enfants, le virus humain obtenu de cas mortels au cours de l'épidémie de 1934 en Californie.

Les vaccins vivants de virus atténués se montrant plus efficaces que les virus tués à l'aide de la chaleur ou par des procédés chimiques, j'ai employé le ricinoléate de sodium (1) comme agent atténuant, non seulement parce qu'il est connu pour ses propriétés désintoxiquantes [3], mais aussi parce que Mc Kinley et Larson [4] ont complètement immunisé trois singes et partiellement un quatrième, en leur donnant des injections intrapéritonéales d'émulsions de virus de moelle épinière de singe, préalablement traitées par le ricinoléate de sodium. Il semble que les virus atténués produisent l'immunité, même lorsqu'ils sont employés en quantités beaucoup moindres que les virus tués. Ils possèdent aussi l'avantage suivant : les virus après l'injection se multiplient probablement plusieurs fois, exercent une stimulation antigénique continue et exigent l'injection de quantités moindres de protéine de moelle épinière; ainsi, ils demandent un effort moins grand aux tissus créant l'anticorps et réduisent la possibilité du développement de la sensibilité allergique.

RÉSULTATS DES VACCINATIONS.

En 1932-1933, Kolmer et Rule [5] réussirent à vacciner un singe partiellement et deux autres animaux complètement, sur une série de six, à l'aide d'injections sous-cutanées et intracutanées d'un vaccin composé de 2 p. 100 de moelle épinière d'un singe poliomyélitique dans une solution de ricinoléate de sodium à 10 p. 100. Plus tard, le vaccin fut composé de 4 p. 100 de virus de moelle épinière dans une solution de solution de ricinoléate de sodium à 1 p. 100 suivant la méthode de préparation déjà décrite [6].

Six singes ont reçu 10 injections sous-cutanées de ce vaccin plus puissant, à la dose de 0 c. c. 5 à 1 cent. cube par kilogramme tous les cinq jours, et 2 autres ont reçu 10 injections de

(1) Je suis reconnaissant à la William S. Merrell Company de Cincinnati, Ohio, de m'avoir permis d'employer cette substance dans la préparation des vaccins.

0 c. c. 1 par voie intracutanée tous les cinq jours. Aucun n'a montré le moindre signe clinique de poliomyélite pendant la période d'immunisation et tous restèrent parfaitement sains. Lorsqu'ils furent inoculés par voie intracérébrale avec 0 c. c. 2 de virus frais à 5 p. 100 (approximativement 18 doses minima infectantes), un mois après la dernière dose, aucun n'a présenté de signes cliniques de poliomyélite, alors que les témoins, inoculés en même temps, ont eu la poliomyélite en l'espace de cinq à neuf jours et ont succombé.

On a fait 5 injections sous-cutanées de 0 c. c. 1 à 1 cent. cube par kilogramme à 7 singes, une tous les cinq jours; 3 autres animaux ont reçu 5 injections de 0 c. c. 1 par voie intracutanée tous les cinq jours. Aucun de ces animaux n'a présenté de signes cliniques de poliomyélite pendant la période d'immunisation. Eprouvés par voie intracérébrale avec 0 c. c. 2 de suspension de virus frais à 5 p. 100, un mois après la dernière dose, tous sont restés en parfaite santé, à l'exception d'un qui ayant reçu 5 injections sous-cutanées de 0 c. c. 1 par kilogramme fut atteint de poliomyélite six jours après l'inoculation; il a survécu, mais la maladie a dégénéré en paralysie. Tous les témoins qui n'avaient pas été vaccinés ont eu la poliomyélite en l'espace de cinq à sept jours après l'inoculation.

Les singes vaccinés ont été inoculés de nouveau par voie intracérébrale sept mois plus tard avec 0 c. c. 2 de suspension de virus à 5 p. 100. Tous sont restés sains. Lorsqu'ils ont été inoculés, de nouveau, dix-sept mois plus tard ou deux ans environ après la vaccination, tous, sauf un, sont restés parfaitement indemnes, de sorte qu'à présent nous pouvons déclarer que l'immunité a persisté chez tous les sujets, sauf un, pendant une période d'au moins deux années après la vaccination.

A la suite de ces observations, M^{lle} Rule et moi, nous nous sommes injecté 0 c. c. 5, 1 c. c. 5 et 2 cent. cubes de vaccin, par voie sous-cutanée tous les cinq jours. Les injections ont été accompagnées de légères douleurs, spécialement après la première injection, mais ces douleurs ont diminué après la deuxième et la troisième injection, et se sont calmées rapidement; il y a eu peu ou pas de réaction locale, sauf toutefois pour les doses de 2 cent. cubes, qui ont produit des réactions comparables à celles que provoquent les injections sous-cutanées

de vaccin rabique. Néanmoins, il n'y a eu ni fièvre, ni réactions générales.

Heureusement, le sérum de notre sang ne possédait aucune propriété antivirale avant l'inoculation, ce qui a été prouvé en mélangeant 0 c. c. 2 de sérum avec 0 c. c. 2 de suspension de virus à 5 p. 100 et en injectant ce mélange, après deux heures de contact, par voie intracérébrale à deux singes. Les deux animaux ont eu la poliomyélite en sept jours environ.

Le fait que trois doses de vaccin ont produit de l'anticorps antiviral a été démontré en répétant l'épreuve deux semaines après la dernière dose de vaccin : deux autres singes, inoculés par voie intracérébrale avec un mélange de 0 c. c. 2 de sérum et 0 c. c. 2 de suspension de virus à 5 p. 100, après deux heures de contact, sont restés en parfaite santé, alors qu'un témoin, inoculé avec le virus seul, a été paralysé en l'espace de six jours et a finalement succombé. Ces résultats ont démontré que dans notre cas personnel le vaccin a été, selon toute apparence, capable de produire l'anticorps pour le virus de la poliomyélite et probablement suffisant pour engendrer l'immunité.

Pendant ces quatre derniers mois, nous avons administré le vaccin à un groupe choisi de 25 enfants âgés de huit mois à quinze ans (voir le tableau). Tous ont été immunisés à la demande ou avec le consentement écrit de leurs parents. 19 de ces enfants étaient à l'hôpital de Temple University. Bien que tous fussent en bonne santé, la majorité étaient convalescents de différentes maladies internes ou chirurgicales.

15 de ces enfants ont été choisis parce qu'ils n'ont montré *aucun* anticorps dans le sang à l'épreuve du pouvoir neutralisant sur le singe; 10 autres avaient de l'anticorps dans le sang, afin de comparer les deux types dans l'étude. Ces épreuves ont été conduites en mélangeant 0 c. c. 5 du sérum avec 0 c. c. 5 d'émulsion du virus à 10 p. 100, en injectant ensuite par voie intracérébrale 0 c. c. 5 de chaque mélange (après environ deux heures de contact au bain-marie à 37°) à des singes anesthésiés par l'éther. Les singes témoins, injectés avec 0 c. c. 5 d'un mélange de 0 c. c. 5 d'eau salée physiologique stérile et de 0 c. c. 5 de virus après deux heures de contact dans les mêmes conditions, ont été atteints de paralysie en l'espace de cinq à neuf jours.

Des observations concernant les variations de température ainsi que des examens du sang ont été faits chez 22 de ces enfants, avant et après chaque dose de vaccin.

Une à trois injections sous-cutanées étaient données à une semaine d'intervalle; la quantité de chaque injection est indiquée dans le tableau.

TABLEAU I.

NUMÉROS	AGE	NOMS	ÉPREUVES préliminaires du sérum pour l'anticorps	DOSAGE du vaccin une fois par semaine	ÉPREUVES finales du sérum pour l'anticorps
1	8 mois.	Raymond B. . .	0	0,25, 0,5, 0,5	0
2	9 mois.	Nicolas V. . . .	0	0,5	+
3	10 mois	Phillip B. . . .	0	0,25, 0,5	+
4	12 mois.	Joseph W. . . .	0	0,25, 0,5, 0,5	0
5	19 mois.	Howard N. . . .	0	0,5	+
6	22 mois.	Francis B. . . .	0	0,25, 0,5, 0,5	+
7	4 ans.	Carolyn D. . . .	0	0,5, 0,5, 1,0	+
8	4 ans 1/2	Margaret Y. . . .	+	0,5, 1,0, 1,0	++
9	5 ans.	Phillip D. . . .	+	0,5, 0,5, 1,0	++
10	5 ans.	Elisabeth M. . . .	0	0,5, 0,5, 1,0	0
11	5 ans.	Harry W.	0	0,5, 0,5, 1,0	0
12	6 ans.	Gloria A.	+	0,5, 1,0, 1,0	++
13	6 ans.	Joseph R.	+	0,5, 0,5, 1,0	++
14	7 ans.	Charles D.	+	0,5, 1,0, 1,0	++
15	7 ans.	Mildred G.	0	0,5, 1,0, 1,0	+
16	7 ans.	Peter L.	0	0,5, 0,5, 0,5	+
17	7 ans.	Elva W.	0	0,5, 0,5, 1,0	++
18	8 ans.	Robert K.	+	0,5, 0,5, 1,0	++
19	8 ans.	Clinton B.	0	0,5, 1,0, 1,0	+
20	10 ans.	Kathryn D. . . .	+	0,5, 1,0, 2,0	++
21	10 ans.	Harold L.	+	0,5, 0,5, 1,0	++
22	11 ans.	Sidney G.	+	0,5, 1,0, 1,0	++
23	11 ans.	Daniel K.	0	0,5, 1,0, 1,0	+
24	11 ans.	George W.	0	0,5, 1,0, 2,0	+
25	15 ans.	John K.	+	0,5, 1,0, 2,0	++

Nota. — 0, pas d'anticorps; +, anticorps présent; ++, anticorps augmenté.

Aucun enfant n'a ressenti de troubles et il n'y a pas eu la moindre évidence d'infection. Des réactions locales à différents degrés ont apparu à l'endroit de l'injection. La première dose a produit chez un des enfants les plus âgés une réaction assez sévère : œdème et érythème, comme après l'injection de toxoïde diphtérique, mais chez les autres enfants les réactions locales ont été faibles.

Durant les premières vingt-quatre heures après l'injection, et en particulier après la première injection, la température de

certains enfants a monté d'une fraction de degré, et seulement dans quelques cas jusqu'à 100.2 F., pour revenir à la normale en quarante-huit heures.

Le nombre total de leucocytes a augmenté de 500 à 1.200 par millimètre cube chez certains enfants pendant les vingt-quatre heures après les injections, en particulier après la première, en raison d'une légère augmentation absolue des polymorphonucléaires neutrophiles. Ce changement et les faibles variations de température sont attribués aux effets des réactions locales, puisqu'ils ont paru varier avec ces dernières.

Les épreuves de neutralisation ont été effectuées une semaine après la dernière dose du vaccin en mélangeant 0 c.c. 5 de sérum à 0 c.c. 5 d'émulsion de virus à 10 p. 100 après contact du mélange à 37° pendant une ou deux heures et en injectant 0 c.c. 5 de chaque mélange par voie intracérébrale à des singes anesthésiés à l'éther.

Sur 15 enfants sans anticorps avant l'immunisation, 11, soit 75 p. 100, ont montré des quantités suffisantes d'anticorps pour neutraliser le virus après l'immunisation, les singes ne montrant aucun symptôme d'infection dans les trois ou quatre semaines après l'inoculation intracérébrale des mélanges du sérum et virus, alors que les témoins, inoculés avec 0 c.c. 1 de virus seul, ont été atteints de paralysie en l'espace de six à neuf jours et ont succombé.

Il est fort probable que nos injections espacées d'une semaine étaient trop rapprochées et que de meilleurs résultats auraient été obtenus en administrant les injections à des intervalles plus longs. De plus, quoique la production d'anticorps chez certains enfants ait paru être assez rapide après l'injection du vaccin, ce que je vais discuter bientôt avec plus de détails, il est probable que les épreuves de neutralisation par le sérum devraient être retardées d'au moins deux semaines après la dernière dose, au lieu d'une semaine seulement, comme nous l'avons fait.

En outre, il faut noter, comme nous l'avons déjà mentionné, que la majorité des enfants compris dans ce groupe étaient convalescents de maladies internes ou chirurgicales, et que, dans ces conditions, la réaction de l'anticorps a pu ne pas être aussi bonne que la réaction des enfants en bon état général.

Néanmoins, malgré ces conditions, la production en larges

quantités d'anticorps chez 75 p. 100 des enfants susceptibles et sans anticorps, au moyen d'une à trois doses du vaccin, sans effets défavorables, en dehors des faibles réactions locales aux endroits de l'injection sous-cutanée, indique un degré satisfaisant et efficace d'immunisation.

De plus, les sérums de 10 enfants dont le sang contenait l'anticorps antiviral avant la vaccination ont montré une augmentation marquée de cet anticorps après l'immunisation, puisque 0 c. c. 5 du sérum mélangé à 0 c. c. 5 d'émulsion de virus à 50 p. 100 puis laissés deux heures à 37° et injectés à la dose de 0 c. c. 5 par voie intracérébrale à des singes anesthésiés à l'éther, ont montré une neutralisation complète. En outre, il apparaît, d'après des épreuves quantitatives supplémentaires, que le vaccin produit probablement plus d'anticorps chez les enfants possédant l'anticorps naturel dans le sang, que chez ceux qui n'en ont pas; cela suggère que les cellules des premiers sujets sont probablement sensibilisées ou préparées (« tuned up ») par l'infection inapparente, d'où résulte la production de grandes quantités supplémentaires d'anticorps après une stimulation supplémentaire du vaccin.

DOSAGE DU VACCIN.

La question du dosage est, bien entendu, très importante. Les singes qui ont reçu un total de 0 c. c. 5 par kilogramme en doses séparées, au moyen d'injections sous-cutanées, ont été vaccinés avec succès. Mais s'il est vrai que l'homme acquiert l'immunité contre la poliomyélite par une infection virulente sans manifestations cliniques, il semble que moins de vaccin par poids du corps suffirait pour l'immuniser d'une façon efficace.

Pensant à cette possibilité, et comme facteur supplémentaire de sécurité, j'ai injecté une première dose de 0 c. c. 25 aux enfants au-dessous de trois ans, et de 0 c. c. 5 aux enfants plus âgés et aux adultes. J'ai fait varier la seconde dose de 0 c. c. 5 à 1 cent. cube, et la troisième de 1 à 2 cent. cubes, comme l'indique le tableau.

Des résultats observés jusqu'à présent, on peut déduire que trois injections sont suffisantes avec les doses suivantes :

De un à trois ans : première, 0 c. c. 25; seconde, 0 c. c. 5; troisième, 0 c. c. 5.

De quatre à dix ans : première, 0 c. c. 5; seconde, 0 c. c. 5; troisième, 1 cent. cube.

De onze à quinze ans : première, 0 c. c. 5; seconde, 1 cent. cube; troisième, 1 cent. cube ou 2 cent. cubes.

Adultes : première, 0 c. c. 5; seconde, 1 cent. cube; troisième, 2 cent. cubes.

Chez les enfants de poids normal, les quantités totales de vaccin variaient à peu près de 0 c. c. 06 à 0 c. c. 1 par kilogramme; donc elles étaient environ de cinq à dix fois plus petites par rapport au poids que celles qui ont été administrées aux singes. Mais j'avais supposé, comme je l'ai déjà dit, que l'homme a besoin de moins de vaccin que les singes par kilogramme de poids; les résultats indiqués dans le tableau semble confirmer cette supposition.

Quoi qu'il en soit, il apparaît qu'une ou deux doses du vaccin seulement ont produit des anticorps en quantité considérable, au moins chez quelques enfants.

Par exemple, le sérum de Nickolas V. (n° 2), âgé de neuf mois, et le sérum de Howard N. (n° 5), âgé de dix-neuf mois, se sont montrés neutralisants quatre jours après une dose de 0 c. c. 5; le sérum de Joseph W. (n° 4), âgé de douze mois, s'est montré complètement neutralisant une semaine après la seconde dose, quoique ce résultat n'ait pas été connu lorsque la troisième dose fut administrée; le sérum de Clinton B. (n° 19), âgé de huit ans, s'est montré neutralisant quatre jours après la première dose de 0 c. c. 5, quoique la seconde et la troisième doses aient été aussi administrées avant que ce résultat fût connu. Ces résultats indiqueraient que, chez certains enfants au moins, une ou deux doses seraient suffisantes, mais puisque Raymond B. (n° 1), Phillip B. (n° 3) et Francis B. (n° 6), n'ont pas montré d'anticorps dans leur sérum une semaine après la première dose, je crois qu'il est bon de donner deux, et même de préférence trois doses de vaccin.

RAPIDITÉ DE LA PRODUCTION DES ANTICORPS.

J'ai donc observé une production plutôt rapide des anticorps dans les cas déjà mentionnés, à savoir : Nickolas V. (n° 2),

Howard N. (n° 5) et Clinton B. (n° 19), puisque leur sérum, prélevé quatre-vingt-seize heures après la première dose de vaccin a donné une neutralisation complète. Dans le cas de Nickolas V., le sérum prélevé quarante-huit heures après la première dose du vaccin paraissait contenir déjà une très faible quantité d'anticorps, car le singe n'a été paralysé que dix-huit jours après l'inoculation intracérébrale, tandis que le singe de contrôle et celui qui avait été éprouvé par le sérum avant que le vaccin ne fût administré ont eu une paralysie sévère de treize à quatorze jours après l'inoculation.

Une autre preuve de la création rapide des anticorps ressort du fait qu'un singe pesant 4 kilogrammes, anesthésié à l'éther, injecté par voie intracérébrale avec 0 c. c. 5 du virus à 5 p. 100, soixante-douze heures après une injection sous-cutanée de 0 c. c. 5 de vaccin, est resté sain, tandis que le singe témoin a été paralysé huit jours après l'inoculation avec seulement 0 c. c. 1 du même virus administré à la même heure. Néanmoins, chez un second singe, qui avait reçu la même dose de vaccin, la réaction des anticorps, quoique présente, n'a pas été aussi bonne, car cet animal, anesthésié à l'éther, a été paralysé à peu près dix-neuf jours après l'injection intracérébrale de 0 c. c. 5 du virus à 5 p. 100.

En somme, il apparaît que l'anticorps peut être produit assez rapidement au cours de la poliomyélite après l'injection sous-cutanée du vaccin, et pour cette raison, je crois que la vaccination peut être une aide dans l'immunisation des individus pendant les épidémies. De plus, comme je l'ai déjà exposé ailleurs [7], il ne semble pas que le vaccin produise une « phase négative » décelable ou une période de susceptibilité accrue, au moins chez les singes, ce qui paraît justifier son emploi pour combattre les épidémies de poliomyélite.

LE VACCIN.

La méthode de préparation du vaccin a déjà été publiée [6]. Il suffit de souligner ici que nous employons une souche de virus de singe de plusieurs passages (Rockefeller Institute) ayant perdu la plus grande partie sinon toute sa virulence pour l'homme.

Les anticorps que produit ce vaccin sont capables de neutra-

liser le virus humain, ce qui ressort du fait, déjà mentionné, que les anticorps du sérum de plusieurs des enfants vaccinés ont neutralisé complètement le virus humain de l'épidémie de 1934 en Californie, virus qui m'a été envoyé aimablement par M. le Docteur Jessel de Los Angeles, et un second virus de singe de troisième passage, qui m'a été envoyé aimablement par M^{lle} Howitt de San Francisco.

Le vaccin ne peut pas être préparé avec du cerveau, car cet organe ne contient pas une quantité suffisante de virus. L'inoculation intracérébrale à des singes de 1 cent. cube d'émulsion de cerveau frais à 50 p. 100 n'a pas infecté, parce que le virus était absent ou présent en quantité insuffisante; mais la moelle épinière d'un singe fournit environ 150 cent. cubes de vaccin, ce qui est suffisant pour immuniser de 40 à 50 enfants, ceci dépendant de l'âge et du dosage.

Je crois que le virus du vaccin est atténué à un certain point par les quantités de ricinoléate de sodium employées. Tandis que l'injection intracérébrale, faite à des singes anesthésiés à l'éther, de 0 c. c. 1 du virus frais à 5 p. 100, a produit la poliomyélite en huit jours environ, l'injection intracérébrale de 0 c. c. 2 de vaccin âgé de trois semaines et contenant 4 p. 100 du virus a produit la poliomyélite en onze jours; tandis que le second vaccin, âgé de deux mois, a produit la paralysie en neuf jours, et le troisième, âgé d'environ cinq mois, en douze jours environ, tous injectés à la dose de 0 c. c. 2 sous anesthésie à l'éther.

On maintient le vaccin à la température de la chambre au moins deux semaines avant de l'employer, et je crois maintenant qu'un mois vaudrait mieux. Après ce temps, l'atténuation du vaccin paraît s'arrêter si le vaccin est conservé à la glacière à 4°, car le vaccin préparé un an auparavant possède encore à peu près la même virulence pour le singe et la même activité vaccinante.

La difficulté principale dans la préparation est d'empêcher la contamination des moelles pendant l'extraction, et aussi de préparer des suspensions fines. Nous plaçons les moelles dans une solution de glycérol chimiquement pur à 50 p. 100 dans de l'eau salée physiologique stérile, pendant au moins un mois avant de les employer dans la préparation du vaccin; dans ces

conditions la grande majorité des vaccins sont trouvés stériles à l'examen bactériologique, très minutieux, par ensemencement.

Quoique le ricinoléate de sodium à 1 p. 100 possède un certain degré d'activité antiseptique (bactériostatic), il est nécessaire de prendre grand soin de ne pas contaminer le vaccin pendant son emploi.

Puisque je n'ai jamais observé de moindre réaction fâcheuse, à l'exception des réactions locales chez les singes et chez les 27 sujets humains vaccinés, je n'ai plus aucune crainte d'infection provenant de l'injection.

Non seulement il est possible que le virus de plusieurs passages ait perdu sa virulence pour l'homme, mais il est certainement atténué par l'emploi du ricinoléate de sodium. De plus, les injections sous-cutanées paraissent ajouter encore un facteur important de sécurité, car elles représentent une porte d'entrée où le virus actif a un degré peu élevé de virulence pour les singes. Le fait que la première dose donnée aux enfants et aux adultes est petite (0 c.c. 25 à 0 c.c. 5), et le fait que l'on attend sept à dix jours avant d'administrer la seconde dose ajoutent encore une garantie étant donné que la réaction de l'anticorps est très prompte. Pour ces raisons, je n'hésite pas à recommander personnellement le vaccin surtout pendant les épidémies. Parmi les premiers qui l'ont reçu étaient mes deux fils (n^{os} 23 et 25), le cadet n'avait pas d'anticorps dans son sérum avant l'administration de la première dose de 0 c. c. 5.

Il n'est pas possible à l'heure actuelle de déterminer la durée de l'immunité après la vaccination, bien que, comme je l'ai déjà dit, les singes qui ont été vaccinés il y a deux ans soient encore immuns aux injections intracérébrales de virus. Pourtant, si l'immunité dure un nombre suffisant d'années pour protéger les enfants pendant l'âge le plus susceptible, jusqu'à ce que l'immunité de maturité soit développée, cela vaut bien la peine.

A notre connaissance, aucune personne ayant suffisamment d'anticorps antiviral dans le sang n'a contracté la poliomyélite. A l'heure actuelle, l'épreuve de neutralisation par le sérum de singe est le procédé le plus sûr pour découvrir cette immunité humorale [4], car les cuti-réactions [8], les réactions avec l'or colloïdal, la réaction de fixation de Bordet et les épreuves de précipitation ont été reconnues imparfaites [9]. L'épreuve

antivirale au singe est à peine nécessaire dans le cas des enfants au-dessous de quatre ans, puisque environ 80 p. 100 sont susceptibles. Dans le cas où l'on ne soumet pas des enfants plus âgés et des adultes à l'épreuve, ce sont les médecins et les parents qui doivent décider la vaccination, mais je crois que le vaccin est à présent disponible pour une immunisation sûre et efficace, en particulier pendant les épidémies. Et, comme il y a probablement une tendance héréditaire à cette maladie, il est surtout important de vacciner les enfants dans les familles où la poliomyélite est déjà survenue.

CONCLUSIONS.

1° Les vaccins vivants, atténués, du virus poliomyélitique de la moelle épinière de singe dans une solution de ricinoléate de sodium à 1 p. 100 ont immunisé avec succès les singes de l'espèce *Macacus rhesus* contre la poliomyélite.

2° On a administré trois doses du vaccin par injections sous-cutanées aux intervalles d'une semaine, sans aucune réaction fâcheuse, à deux adultes chez lesquels se sont développées de grandes quantités d'anticorps.

3° 25 enfants âgés de huit mois à quinze ans ont reçu une à trois injections de vaccin sur la demande et avec le consentement de leurs parents.

4° 15 de ces enfants n'avaient pas d'anticorps dans les épreuves de neutralisation par le sérum avant l'immunisation et 11 d'entre eux ont montré de grandes quantités d'anticorps dans le sang une semaine après la dernière dose de vaccin.

5° 10 de ces enfants ont montré la présence d'anticorps antiviral dans le sang avant l'immunisation, mais chez tous on a constaté une augmentation importante de ces anticorps après la vaccination; de sorte que le vaccin a produit de grandes quantités d'anticorps chez 23 sur 27 vaccinés (85 p. 100).

6° Aucun des 25 enfants n'a présenté la moindre réaction fâcheuse au vaccin.

7° De faibles réactions locales se sont manifestées aux endroits de l'injection sous-cutanée, avec une légère élévation de température et une leucocytose insignifiante, qui ont disparu en quarante-huit heures.

8° Le dosage pour les enfants d'un à trois ans a été : 0 c. c. 25, 0 c. c. 5 et 0 c. c. 5, à une semaine d'intervalle ; pour les enfants de quatre à dix ans : 0 c. c. 5, 0 c. c. 5 et 1 cent. cube ; pour les enfants de onze à quinze ans : 0 c. c. 5, 1 cent. cube et 1 cent. cube ou 2 cent. cubes. Pour les adultes, les doses recommandées sont : 0 c. c. 5, 1 cent. cube et 2 cent. cubes.

9° Le vaccin est préparé avec de la moelle épinière seulement, car le cerveau contient trop peu de virus. La moelle d'un singe fournira 150 cent. cubes environ de vaccin, ce qui est suffisant pour immuniser de 40 à 50 enfants selon l'âge et le dosage.

10° Il est probable que le maximum de réaction d'anticorps serait obtenu en administrant les injections tous les dix jours au lieu de toutes les semaines.

11° La production des anticorps paraît pourtant être assez rapide, puisque chez 3 enfants susceptibles on a trouvé l'anticorps dans le sang quatre jours après la première injection du vaccin ; en outre un singe était complètement immunisé et un autre immunisé partiellement quarante-huit heures après l'injection sous-cutanée de 0 c. c. 5 du vaccin par animal.

12° Le vaccin ne paraît pas produire de « phase négative » démontrable de susceptibilité accrue après l'injection.

13° Le vaccin est considéré comme entièrement sans danger pour l'immunisation de l'homme non seulement parce qu'il est préparé avec du virus de plusieurs passages, qui a probablement perdu sa virulence pour l'homme, mais aussi en raison de son atténuation par le ricinoléate de sodium, de la voie sous-cutanée de l'administration et de l'injection d'une première petite dose.

14° La quantité d'anticorps produits par l'immunisation est comparable à celle qui se trouve dans le sang dans l'immunité naturelle ; on la croit suffisante pour protéger contre la poliomyélite antérieure aiguë. La durée de l'immunité après la vaccination est inconnue, mais elle a été de près de deux ans chez les singes vaccinés.

15° Nous croyons que le vaccin est à présent prêt pour la vaccination, surtout des enfants, contre la poliomyélite, en particulier pendant les épidémies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.). *Journ. Immunology*. (Sous presse).
- [2] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.). *Amer. Journ. Med. Sci.* (Sous presse).
- [3] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.) et MADDEN (B.). *Journ. Lab. and Clin. Med.*,
19, 972, 1934.
- [4] MC KINLEY (J. C.) et LARSON (W. P.). *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 24,
297, 1927.
- [5] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.). *Journ. Immunology*, 26, 505, 1934.
- [6] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.). *Amer. Journ. Med. Sci.*, 188, 510, 1934.
- [7] KOLMER (J. A.). *Amer. Journ. Med. Sci.* (Sous presse).
- [8] KOLMER (J. A.), KLUGH (G.) et RULE (A. M.). *Journ. Immunology*. (Sous
presse).
- [9] KOLMER (J. A.) et RULE (A. M.). *Journ. Immunology*. (Sous presse).

LA CUTI-RÉACTION A LA TOXINE DIPHTÉRIQUE SA VALEUR ET SES INDICATIONS

par TH. REH.

*(Institut d'hygiène et de bactériologie de l'Université
de Genève.)*

Lors de nos premiers essais pour substituer une cuti-réaction avec une toxine hyperactive à l'intradermo-réaction avec la toxine diluée — selon Schick —, essais relatés à la séance du 18 janvier 1934 de la Société Médicale de Genève (1), nous laissions entrevoir le caractère spécifique de cette cuti-réaction renforcé encore par l'absence probable de toute pseudo-réaction. Nous ajoutons que sa valeur pratique et sa technique devaient encore être contrôlées sur des collectivités plus nombreuses. En effet, nos essais ne comportaient alors que 55 cas, de tout âge, vaccinés ou non contre la diphtérie.

En mai 1934, nous pouvions déjà, d'après une expérience portant sur 125 cas, fixer la technique, l'évolution et l'interprétation de la cuti-réaction (2).

Enfin, en décembre 1934, nous faisons un rapport sur 150 cas probants d'application de notre méthode à l'assemblée annuelle des médecins officiels au service fédéral de l'hygiène publique.

Le total de nos cas s'élève aujourd'hui à 230, chez lesquels la cuti-réaction à la toxine diphtérique a prouvé sa valeur comme test de réceptivité et sa supériorité pratique sur l'intradermo-réaction de Schick.

Ces cas se répartissent comme il suit, d'après l'âge :

De 0 à 2 ans.	26
De 2 à 10 ans.	147
De 10 à 15 ans.	31
De 15 à 20 ans.	21
Au-delà	5

(1) *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, n° 22, 1934.

(2) *Revue Médicale de la Suisse Romande* du 25 mai 1934.

Le plus jeune avait six mois, le plus âgé quarante-cinq ans. Quel que fût l'âge du sujet, la cuti-réaction fut toujours bien tolérée; il n'en résulta jamais de complications locales ou générales.

Après l'avoir pratiquée au début avec de la toxine titrant 16 unités antigènes (1) [toxines servant à la fabrication de l'anatoxine à trois injections], nous n'avons utilisé par la suite que des toxines titrant 30 à 35 unités antigènes (1) [toxines servant à la fabrication de l'anatoxine pour la vaccination en deux injections]. Ces toxines, tout en conservant à la méthode son innocuité, donnaient des réactions plus nettes, de lecture plus aisée. L'absence de toute pseudo-réaction nous ayant été confirmée par 125 cas, où des Schick de contrôle provoquaient parfois de fausses réactions, nous avons renoncé dès lors à l'emploi concomitant de toxine chauffée.

La technique définitivement adoptée fut la suivante : Au moyen d'un mouvement en vrille imprimé au vaccinostyle, on fait deux scarifications cutanées punctiformes sur l'avant-bras, distantes de 5 centimètres et on dépose sur la scarification inférieure, la supérieure servant de témoin, 1 goutte de toxine qu'on laisse sécher à l'air.

La lecture de la réaction se faisait dès le deuxième jour; elle était des plus nettes au troisième.

Les cuti-réactions à la toxine diphtérique furent, à deux exceptions près, de même sens que les intradermo-réactions de Schick, faites concurremment dans 170 cas. Si nos 230 cas n'ont pas tous été contrôlés par le Schick, cela tient au fait que, dans la dernière école où nous avons pratiqué la cuti-réaction, nous n'avons pu procéder qu'à des Schick en « coups de sonde ». Le temps matériel nous manquait pour rechercher les deux réactions sur chacun des 97 élèves.

Abstraction faite de son innocuité et de sa spécificité, caractères qu'elle partage avec l'intradermo-réaction de Schick, la cuti-réaction a sur cette dernière l'avantage :

D'être plus simple et plus facile comme exécution ;

De ne pas nécessiter le recours à une toxine diluée et peu

(1) Toxines dues à l'obligeance de M. Ramon. Depuis le mois de juin 1934 nous nous sommes servi de la même toxine conservée à la glacière, toxine reçue le 4 juin 1934 et titrant 35 unités antigènes.

stable, mais d'employer une toxine pure, facile à conserver à la glacière ;

D'être d'interprétation plus sûre, ne donnant pas lieu à une pseudo-réaction ;

De permettre une lecture plus rapide, possible dès le second jour (zone d'hyperémie de 3 à 15 millimètres, centrée le plus souvent d'une vésico-croûte) ;

De jouer enfin, probablement, un certain rôle d'antigène par la quantité minime de toxine à titre élevé qu'elle laisse pénétrer dans l'organisme.

Du fait de sa spécificité, les indications de la cuti-réaction coïncident avec celles de l'intradermo-réaction de Schick, mais sa simplicité en permet une application plus étendue, tant comme test de réceptivité (discrimination des sujets à vacciner) que comme contrôle d'efficacité de la vaccination. (Nous nous en servons actuellement, à l'exclusion du Schick, pour tous les élèves que nous adresse à cet effet le médecin en chef des écoles.)

Du fait de sa précocité (apparition dès le second jour), la cuti-réaction rend possible — ce qui n'est pas le cas pour l'intradermo-réaction d'apparition lente — un cuti-diagnostic suffisamment rapide des angines banales chez les porteurs de bacilles de Löffler pour pouvoir servir de cuti-pronostic.

L'existence d'angines banales chez les porteurs de bacilles de Löffler entrevue en 1917 par Stévenin (1), angines en imposant pour des angines diphtériques légitimes, fut confirmée ultérieurement par la constatation fréquente d'un état réfractaire (Schick négatif) chez des sujets atteints d'angine avec présence de bacilles de Löffler. Ces angines affectaient l'évolution bénigne qu'on a coutume de rencontrer dans les cas de diphtérie chez les vaccinés.

Tout récemment, M. Dopter (1), dans une mise au point de la question, rapporte avec les observations de ses prédécesseurs, celles qui résultent d'une enquête prescrite par lui concernant les militaires atteints d'angines avec présence de bacilles de Löffler, militaires vaccinés contre la diphtérie ou non vaccinés, mais à Schick négatif. Cette enquête, qui comportait

(1) DOPTER, La notion des angines banales chez les porteurs de bacilles diphtériques. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 18 décembre 1934.

144 cas utilisables (c'est-à-dire à Schick précédant la première injection de sérum), permet d'établir les faits suivants.

Sur 74 sujets vaccinés contre la diphtérie, le Schick s'est montré négatif soixante-cinq fois, donc angines diphtériques vraies seulement dans 9 cas. Sur 70 sujets non vaccinés contre la diphtérie, le Schick s'est montré négatif cinquante-cinq fois, donc diphtérie en cause quinze fois seulement.

Par ailleurs, M. Dopter conclut que si la notion de l'existence d'angines banales chez les porteurs de germes est appelée à renforcer la confiance en l'efficacité de la vaccination, et en la valeur spécifique de la réaction de Schick, elle ne saurait avoir de portée vraiment pratique. La réponse fournie par la réaction négative de Schick ne peut être obtenue, en effet, que six à sept jours après l'injection intradermique de toxine, date trop éloignée du début de la maladie. Or, la cuti-réaction à la toxine diphtérique permet d'établir dès le deuxième jour la réceptivité ou l'état réfractaire du sujet atteint d'une angine à bacilles de Löffler.

Cette discrimination rapide n'autorise, il est vrai — pas plus que ne le ferait d'ailleurs un Schick négatif, avant l'atteinte — de modification quelconque dans le traitement spécifique ou dans les mesures prophylactiques. Mais, vu l'évolution généralement peu grave des angines chez les porteurs, la cuti-réaction permet, si elle est négative, de porter dès les premiers jours de la maladie un pronostic de bénignité probable.

Test de réceptivité ou d'état réfractaire à réponse rapide, elle peut donc servir utilement au cuti-diagnostic et au cuti-pronostic des angines à bacilles de Löffler.

ERRATA (55, n° 1, juillet 1935).

Mémoire CR. VAN GOIDSENHOVEN et GEORGES BERTRAND (p. 74).

Les clichés 1 à 21 ayant été transposés, le numérotage des deux planches de figures (pp. 98 et 99) doit être rétabli comme il suit :

FIG. 1 correspond à FIG. 7 de l'explication des planches (p. 101).

FIG. 2	—	8	—
FIG. 3	—	9	—
FIG. 4	—	6	—
FIG. 6	—	4	—
FIG. 7	—	12	—
FIG. 8	—	11	—
FIG. 9	—	10	—
FIG. 10	—	13	—
FIG. 11	—	14	—
FIG. 12	—	15	—
FIG. 13	—	3	—
FIG. 14	—	2	—
FIG. 15	—	1	—
FIG. 19	—	21	—
FIG. 21	—	19	—

Page 101 (explication des planches), fig. 2. Lire : Colonie en bouton (à gauche) et en cocarde (à droite).

Page 102, fig. 19. Lire : Colonie en cratère de bacille de Chauveau (en bas).

Le Gérant : G. MASSON.